

## TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

Expéditeur : le BUREAU INTERNATIONAL

PCT

NOTIFICATION RELATIVE  
A LA PRESENTATION OU A LA TRANSMISSION  
DU DOCUMENT DE PRIORITE

(instruction administrative 411 du PCT)

Destinataire:

AUDIER, Philippe  
c/o Brevatome  
3, rue du Docteur Lancereaux  
F-75008 Paris  
FRANCE

Date d'expédition (jour/mois/année) 02 mars 2001 (02.03.01)	NOTIFICATION IMPORTANTE
Référence du dossier du déposant ou du mandataire B 13325.3 EE	
Demande internationale no PCT/FR00/02702	Date du dépôt international (jour/mois/année) 29 septembre 2000 (29.09.00)
Date de publication internationale (jour/mois/année) Pas encore publiée	Date de priorité (jour/mois/année) 30 septembre 1999 (30.09.99)
Déposant COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE etc	

- La date de réception (sauf lorsque les lettres "NR" figurent dans la colonne de droite) par le Bureau international du ou des documents de priorité correspondant à la ou aux demandes énumérées ci-après est notifiée au déposant. Sauf indication contraire consistant en un astérisque figurant à côté d'une date de réception, ou les lettres "NR", dans la colonne de droite, le document de priorité en question a été présenté ou transmis au Bureau international d'une manière conforme à la règle 17.1.a) ou b).
- Ce formulaire met à jour et remplace toute notification relative à la présentation ou à la transmission du document de priorité qui a été envoyée précédemment.
- Un **astérisque(\*)** figurant à côté d'une date de réception dans la colonne de droite signale un document de priorité présenté ou transmis au Bureau international mais de manière non conforme à la règle 17.1.a) ou b). Dans ce cas, **l'attention du déposant est appelée** sur la règle 17.1.c) qui stipule qu'aucun office désigné ne peut décider de ne pas tenir compte de la revendication de priorité avant d'avoir donné au déposant la possibilité de remettre le document de priorité dans un délai raisonnable en l'espèce.
- Les **lettres "NR"** figurant dans la colonne de droite signalent un document de priorité que le Bureau international n'a pas reçu ou que le déposant n'a pas demandé à l'office récepteur de préparer et de transmettre au Bureau international, conformément à la règle 17.1.a) ou b), respectivement. Dans ce cas, **l'attention du déposant est appelée** sur la règle 17.1.c) qui stipule qu'aucun office désigné ne peut décider de ne pas tenir compte de la revendication de priorité avant d'avoir donné au déposant la possibilité de remettre le document de priorité dans un délai raisonnable en l'espèce.

<u>Date de priorité</u>	<u>Demande de priorité n°</u>	<u>Pays, office régional ou office récepteur selon le PCT</u>	<u>Date de réception du document de priorité</u>
30 sept 1999 (30.09.99)	99/12230	FR	24 octo 2000 (24.10.00)

Bureau international de l'OMPI  
34, chemin des Colombettes  
1211 Genève 20, Suisse

no de télécopieur (41-22) 740.14.35

Fonctionnaire autorisé:

Ellen Moyse

no de téléphone (41-22) 338.83.38

## TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

AVIS INFORMANT LE DEPOSANT DE LA  
COMMUNICATION DE LA DEMANDE  
INTERNATIONALE AUX OFFICES DESIGNES

(règle 47.1.c), première phrase, du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

AUDIER, Philippe  
c/o Brevatome  
3, rue du Docteur Lancereaux  
F-75008 Paris  
FRANCE

BREVATOME

13 AVR. 2001

3, rue du Docteur Lancereaux  
75008 PARIS

Date d'expédition (jour/mois/année)

05 avril 2001 (05.04.01)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire

B 13325.3 EE

## AVIS IMPORTANT

Demande internationale no

PCT/FR00/02702

Date du dépôt international (jour/mois/année)

29 septembre 2000 (29.09.00)

Date de priorité (jour/mois/année)

30 septembre 1999 (30.09.99)

Déposant

COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE etc

1. Il est notifié par la présente qu'à la date indiquée ci-dessus comme date d'expédition de cet avis, le Bureau international a communiqué, comme le prévoit l'article 20, la demande internationale aux offices désignés suivants:
- US

Conformément à la règle 47.1.c), troisième phrase, ces offices acceptent le présent avis comme preuve déterminante du fait que la communication de la demande internationale a bien eu lieu à la date d'expédition indiquée plus haut, et le déposant n'est pas tenu de remettre de copie de la demande internationale à l'office ou aux offices désignés.

2. Les offices désignés suivants ont renoncé à l'exigence selon laquelle cette communication doit être effectuée à cette date:

CA,EP,JP

La communication sera effectuée seulement sur demande de ces offices. De plus, le déposant n'est pas tenu de remettre de copie de la demande internationale aux offices en question (règle 49.1)a-bis)).

3. Le présent avis est accompagné d'une copie de la demande internationale publiée par le Bureau international le 05 avril 2001 (05.04.01) sous le numéro WO 01/23866

## RAPPEL CONCERNANT LE CHAPITRE II (article 31.2)a) et règle 54.2)

Si le déposant souhaite reporter l'ouverture de la phase nationale jusqu'à 30 mois (ou plus pour ce qui concerne certains offices) à compter de la date de priorité, la demande d'examen préliminaire international doit être présentée à l'administration compétente chargée de l'examen préliminaire international avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité.

Il appartient exclusivement au déposant de veiller au respect du délai de 19 mois.

Il est à noter que seul un déposant qui est ressortissant d'un Etat contractant du PCT lié par le chapitre II ou qui y a son domicile peut présenter une demande d'examen préliminaire international.

## RAPPEL CONCERNANT L'OUVERTURE DE LA PHASE NATIONALE (article 22 ou 39.1))

Si le déposant souhaite que la demande internationale procède en phase nationale, il doit, dans le délai de 20 mois ou de 30 mois, ou plus pour ce qui concerne certains offices, accomplir les actes mentionnés dans ces dispositions auprès de chaque office désigné ou élu.

Pour d'autres informations importantes concernant les délais et les actes à accomplir pour l'ouverture de la phase nationale, voir l'annexe du formulaire PCT/IB/301 (Notification de la réception de l'exemplaire original) et le volume II du Guide du déposant du PCT.

Bureau international de l'OMPI  
34, chemin des Colombettes  
1211 Genève 20, Suisse

no de télécopieur (41-22) 740.14.35

Fonctionnaire autorisé

J. Zahra

no de téléphone (41-22) 338.83.38

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter Application No  
PCT/FR 00/02702

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 7 G01N21/17 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7 G01N C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

COMPENDEX, EPO-Internal, INSPEC, WPI Data, PAJ

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ADELHELM K ET AL: "Development of a sensitive detection system based on the photothermal effect for biomolecular interaction studies" BIOMEDICAL OPTOELECTRONICS IN CLINICAL CHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY; BARCELONA, SPAIN SEP 14-15 1995, vol. 2629, 14 September 1995 (1995-09-14), pages 325-333, XP000925207 Proc SPIE Int Soc Opt Eng; Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering 1996 Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers, Bellingham, WA, USA the whole document	1,3,5-8, 10-12,14
A	--- -/--	2,4

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*G\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 January 2001

Date of mailing of the international search report

02/02/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Scheu, M

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern Application No  
PCT/FR 00/02702

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 874 213 A (CUMMINS LENDELL L ET AL) 23 February 1999 (1999-02-23) column 1, line 8 - line 11 column 7, line 26 - line 47 column 9, line 11 - line 16 column 9, line 37 - line 46	1,2
X	ODAKE TAMAO ET AL: "High-speed separation using miniaturized slab gel and high spatial resolution detection by thermal lens microscope" PROCEEDINGS OF THE 1998 THERMAL THERAPY, LASER WELDING, AND TISSUE INTERACTION; STOCKHOLM, SWE SEP 9-SEP 11 1998, vol. 3565, 9 September 1998 (1998-09-09), pages 126-133, XP000925278 Proc SPIE Int Soc Opt Eng; Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering 1999 Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers, Bellingham, WA, USA	14
A	the whole document	1
A	KITAMORI T: "Chemistry and analysis in integrated chemistry lab on chip" DIGEST OF PAPERS. MICROPROCESSES AND NANOTECHNOLOGY '99. 1999 INTERNATIONAL MICROPROCESSES AND NANOTECHNOLOGY CONFERENCE, DIGEST OF PAPERS. MICROPROCESSES AND NANOTECHNOLOGY '99. 1999 INTERNATIONAL MICROPROCESSES AND NANOTECHNOLOGY CONFERENCE, YOKOHA, pages 70-71, XP000925538 1999, Tokyo, Japan, Japan Society of Applied Physics, Japan ISBN: 4-930813-97-2 the whole document	1,14

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Interr. Application No  
PCT/FR 00/02702

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5874213 A	23-02-1999	US 6045995 A	04-04-2000
		AU 3368695 A	14-03-1996
		WO 9606189 A	29-02-1996
<hr/>			

10 10 88522  
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

RECEIVED  
JUN 27 2002  
TECH CENTER 1600/2900

Applicant's or agent's file reference B 13325.3 EE	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/FR00/02702	International filing date (day/month/year) 29 September 2000 (29.09.00)	Priority date (day/month/year) 30 September 1999 (30.09.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC G01N 21/17		
Applicant COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>6</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of <u>2</u> sheets.</p>
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>

Date of submission of the demand 17 March 2001 (17.03.01)	Date of completion of this report 07 February 2002 (07.02.2002)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR00/02702

## I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:\*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:  
pages \_\_\_\_\_ 1-31 \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☒ the claims:  
pages \_\_\_\_\_ 4 (in part), 5-10 \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_ 1-3, 4 (in part), 11-13 \_\_\_\_\_, filed with the letter of 03 December 2001 (03.12.2001)
- ☒ the drawings:  
pages \_\_\_\_\_ 1/6-6/6 \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the sequence listing part of the description:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.  
These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR 00/02702

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

## 1. Statement

Novelty (N)	Claims	2, 4, 10-13	YES
	Claims	1, 3, 5-9	NO
Inventive step (IS)	Claims	12, 13	YES
	Claims	2, 4, 10, 11	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-13	YES
	Claims		NO

## 2. Citations and explanations

## 1. The following documents are referred to:

D1: ADELHELM K. ET AL.: "Development of a sensitive detection system based on the photothermal effect for biomolecular interaction studies", BIOMEDICAL OPTOELECTRONICS IN CLINICAL CHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY; BARCELONA, SPAIN, SEP. 14-15 1995, Vol. 2629, 14 September 1995 (1995-09-14), pages 325-333, XP000925207 Proc SPIE Int Soc Opt Eng; Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering 1996 Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers, Bellingham, WA, USA;

D2: US-A-5 874 213 (CUMMINS LENDELL L. ET AL.) 23 February 1999 (1999-02-23);

D3: ODAKE TAMAO ET AL.: "High-speed separation using miniaturized slab gel and high spatial resolution detection by thermal lens microscope", PROCEEDINGS OF THE 1998 THERMAL THERAPY, LASER WELDING, AND TISSUE INTERACTION; STOCKHOLM, SWE, SEP. 9-SEP. 11 1998, Vol. 3565, 9 September 1998 (1998-09-09), pages 126-133, XP000925278, Proc SPIE Int Soc Opt



Eng; Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering 1999 Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers, Bellingham, WA, USA.

2. Relevance of documents D1 and D2:

D1 and D2 disclose procedures for detecting nucleic acids using a mirage effect method. However, since nothing in these documents suggests that the detection of nucleic acids can be carried out without prior labelling by means of absorbing molecules, these documents are no longer considered to be relevant in relation to the new independent Claims 1-3, all of which claim the detection of the species without labelling same.

3. Novelty of independent Claim 1 in relation to D3:

D3 (see abstract and drawings) discloses a two-stage method for detecting nucleic acids (DNA fragments). The first stage involves dividing a DNA sample into a plurality of DNA fragments by electrophoresis carried out on a gel supporting the said sample. The second stage involves detecting the said DNA fragments immobilised on the said gel using a mirage effect method.

Since D3 does not indicate that this detection requires said fragments to be associated with absorbing molecules to assist the detection (see entire document), and since a detection method can be considered to be a characterisation method, D3 discloses a method which is identical to the method defined in the new Claim 1 of the present application.

Consequently, the present application does not meet the requirements of PCT Article 33(2).

4. Independent Claim 2:

Given that the amplitude of the detected photothermal signal is clearly a function of the concentration of the species detected (see D3, page 127, last paragraph), a person skilled in the art reading D3 would not hesitate to use the method described in that document for quantitative analysis. He would thus achieve a method as defined in Claim 2 of the application without having to exercise inventive skill. Consequently, the present application does not meet the requirements of PCT Article 33(3).

5. Independent Claim 3:

Since it is clear that in D3 the support (gel) undergoes scanning (see for example Figures 2 and 3), the method of D3 is considered to be a mapping method. The subject matter of this claim is therefore not novel.

6. Dependent Claims:

6.1 The use of the detection method described in D3 for analysing a support of the type defined in Claim 4 would be obvious to a person skilled in the art, since it would be clear to him that the gel used in D3 can be replaced by any suitable support.

6.2 The subject matter of Claims 5-9 is not novel in relation to D3 (see page 130 in particular).

6.3 The features of Claims 10 and 11 are not inventive, because depending on the nucleic acids to be detected, a person skilled in the art would naturally be led to select a detection range and excitation laser as defined in these claims.

6.4 However, the subject matter of Claims 12 and 13 appears to be novel and inventive in relation to the available prior art.

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
5 avril 2001 (05.04.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
WO 01/23866 A1

(51) Classification internationale des brevets:  
G01N 21/17, C12Q 1/68

Françoise [FR/FR]; 22, Boulevard E. Rey, F-38000  
Grenoble (FR). CHATON, Patrick [FR/FR]; "Loutre",  
F-38570 Theys (FR).

(21) Numéro de la demande internationale:

PCT/FR00/02702

(74) Mandataire: AUDIER, Philippe; c/o Brevatome, 3, rue  
du Docteur Lancereaux, F-75008 Paris (FR).

(22) Date de dépôt international:

29 septembre 2000 (29.09.2000)

(81) États désignés (national): CA, JP, US.

(25) Langue de dépôt:

français

(84) États désignés (régional): brevet européen (AT, BE, CH,  
CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT,  
SE).

(26) Langue de publication:

français

(30) Données relatives à la priorité:

99/12230 30 septembre 1999 (30.09.1999) FR

Publiée:

— Avec rapport de recherche internationale.  
— Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des  
revendications, sera republiée si des modifications sont  
reçues.

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US): COM-  
MISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE [FR/FR];  
31/33, rue de la Fédération, F-75752 Paris 15ème (FR).

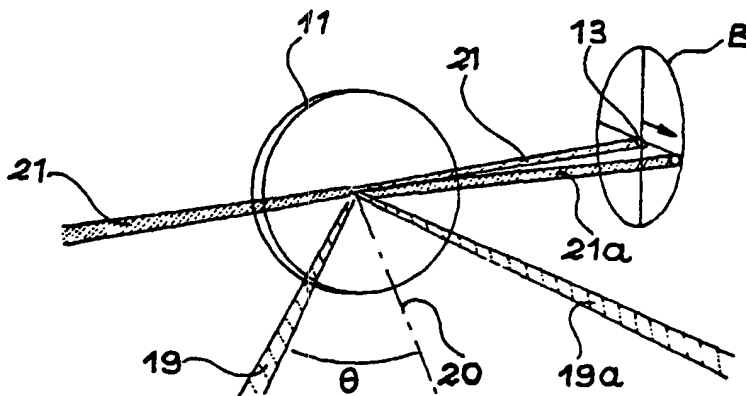
En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-  
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et  
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de  
la Gazette du PCT.

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement): VINET,

(54) Title: METHOD AND DEVICE FOR ANALYSING NUCLEIC ACIDS IMMOBILISED ON A SUPPORT

(54) Titre: PROCEDE ET DISPOSITIF D'ANALYSE D'ACIDES NUCLEIQUES FIXES SUR UN SUPPORT



(57) Abstract: The invention concerns in particular a method for characterising, quantifying or mapping a nucleic acid or a nucleic acid nitrogenous base immobilised on a support. The inventive method uses a photothermal process or by mirage effect. The invention also concerns a method for making a nucleic acid biochip consisting in particular of a solid support whereon is immobilised at least a nucleic acid, and a device for implementing said inventive method.

(57) Abrégé: La présente invention se rapporte notamment à un procédé de caractérisation, de quantification ou de cartographie d'un acide nucléique ou d'une base azotée d'un acide nucléique fixé(e) sur un support. Le procédé de l'invention utilise une méthode photothermique ou par effet mirage. La présente invention se rapporte également à un procédé de fabrication d'une biopuce à acides nucléiques formée notamment d'un support solide sur lequel est fixé au moins un acide nucléique, ainsi qu'à un dispositif de mise en oeuvre du procédé de la présente invention.

WO 01/23866 A1

**PROCEDE ET DISPOSITIF D'ANALYSE D'ACIDES NUCLEIQUES  
FIXES SUR UN SUPPORT**

**DESCRIPTION**

5

**Domaine technique**

La présente invention se rapporte notamment à un procédé de caractérisation, de quantification et de cartographie d'une base azotée, d'un acide nucléique, ou d'une base azotée d'un acide nucléique, fixé(e) sur un support. Elle se rapporte également à un procédé de fabrication d'une biopuce à acides nucléiques formée notamment d'un support solide sur lequel est fixé au moins un acide nucléique, ainsi qu'à un dispositif de mise en oeuvre du procédé de la présente invention.

De manière générale, la présente invention trouve une application dans le domaine des dispositifs d'analyse chimique ou biologique utilisés pour le séquençage et l'étude de l'expression des gènes.

Par exemple, ces dispositifs peuvent être constitués d'un ensemble de sondes moléculaires identiques ou différentes, par exemple d'acides nucléiques, fixées sur la surface miniaturisée d'un support, ou micro-surface. Ils constituent ce qui est habituellement appelé une biopuce, ou puce à ADN lorsque l'acide nucléique est un acide désoxyribonucléotidique et puce à ARN lorsque l'acide nucléique est un acide ribonucléotidique. L'ensemble des acides nucléiques fixés sur les micro-surfaces de support forme une matrice de sondes.

Au cours de l'analyse d'un échantillon au moyen d'une puce à ADN, les acides nucléiques cible d'un extrait sont marqués et déposés sur la matrice de sondes. L'hybridation, c'est-à-dire l'appariement entre  
5 les molécules d'acides nucléiques complémentaires, entre les sondes et les cibles marquées, permet de repérer et d'identifier les séquences d'acides nucléiques présentes dans l'échantillon analysé.

De nombreux procédés de fabrication de biopuces  
10 ont été décrits et développés ces dernières années pour améliorer la miniaturisation et la capacité ou densité de sites d'analyse sur une puce.

Parmi ceux-ci, certains consistent à synthétiser in situ des acides nucléiques sondes sur des substrats  
15 structurés. La méthode de synthèse fait appel à deux modes d'adressage différents pour structurer le substrat : soit à un mode d'adressage manuel, ou mécanique, soit à un mode d'adressage photochimique ou utilisant des techniques de lithographie.

20 Le premier mode d'adressage est un adressage manuel au moyen d'un microrobot ou en utilisant un synthétiseur automatique couplé à la structure du substrat. Ce mode d'adressage est décrit par exemple dans le document Southern EM, Nucleic Acid Research,  
25 25 avril 1994, 22(8) : 1368-1373.

Une amélioration significative des techniques de dépôt par micropipetage à l'aide de microrobots ou par des méthodes d'impression par jet permet d'envisager des procédés industriels de réalisation des sondes par  
30 des méthodes de synthèse chimique. Les documents WO-A-94 27719 de PROTOGENE LAB INC. et A.P. Blanchard,

R.J. Kaiser, L.E. Hood, Biosensors and Bioelectronics, vol. 11, n°6/7, pages 687 à 690, 1996 décrivent l'utilisation de techniques d'impression par jet pour distribuer sur différents sites de la biopuce à ADN les quatre nucléotides activés de base de l'ADN ainsi que les réactifs de couplage.

Le deuxième mode d'adressage comprenant les techniques d'adressage photochimique et les techniques lithographiques est décrit par exemple dans Affymetrix, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996, Nov. 26 ; 93(24), 13555-60.

Dans ces deux modes d'adressage, la synthèse met en jeu des réactions classiques de couplage par l'intermédiaire de phosphoramidites ou phosphites pour une condensation successive des nucléosides judicieusement protégés. Le document Caruthers, Science, Oct. 85, page 281 décrit un cycle de synthèse comprenant les étapes de déprotection, de couplage, de blocage ("capping") et d'oxydation. Ce cycle permet de faire croître l'oligonucléotide à partir de la surface du support constituant la biopuce.

Contrairement à certains modes d'adressage, dans lesquels l'oligonucléotide est présynthétisé et donc purifié et qualifié avant d'être greffé sur le support solide, les deux modes d'adressage précités requièrent une caractérisation des acides nucléiques synthétisés après chaque étape de couplage des nucléotides car il n'y a pas de possibilité de purification après la synthèse.

Par exemple, une synthèse sur support solide dans des sites de (100x100)  $\mu\text{m}^2$  à partir de quantités de

réactifs de quelques nl nécessite une optimisation du procédé de synthèse afin d'obtenir un rendement de couplage le plus proche possible de 100%. En effet, la qualité de l'hybridation va dépendre de la pureté des  
5 sondes synthétisées. Il est donc nécessaire de qualifier chaque étape de synthèse et de pouvoir vérifier les séquences synthétisées.

De plus, après la réalisation de la synthèse des oligonucléotides, un contrôle de la densité des sondes  
10 ainsi que l'uniformité de cette densité sur le substrat doit être effectué.

#### Etat de la technique

La méthode la plus utilisée pour les calculs de  
15 rendement par étape est la mesure de l'absorption à 500 nm des cations diméthoxytrityl après déprotection des nucléosides. Cette méthode est par exemple décrite dans Tetrahedron Letters, vol. 25, n°4, pages 375 à 378, 1984.

20 Selon les quantités de sondes synthétisées les absorbances à mesurer peuvent varier entre 0,2 et  $10^{-3}$ , cette absorption est en général mesurée par un spectromètre à double faisceau dont la précision absolue est de l'ordre de 0,1%. Il se pose un problème  
25 de sensibilité de l'instrument de caractérisation nécessaire à la synthèse in situ. Si la mesure d'absorbance est suffisamment précise  $<10^{-3}$ , il est possible de calculer le rendement par étape. Cette mesure n'est pas spécifique d'une base et ne peut donc  
30 pas donner d'indication sur la séquence synthétisée. Le dosage du cation trityl est global pour l'ensemble du



substrat, il permet de calculer une densité moyenne de sondes par substrat mais ne donne aucune indication sur son uniformité.

Le document Pease A.C. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, mai 1994, vol. 91, pages 5022 à 5026 décrit une mesure de la fluorescence après hybridation avec des sondes marquées équivalentes aux sondes synthétisées qui permet de déterminer les séquences. Mais cette mesure intervient après la synthèse complète des sondes, aucune information sur le rendement étape par étape ne peut être obtenue.

Une amélioration de cette technique vient d'être proposée par Affymetrix dans Glen Mac Gall, J. Org. Chem., 1998, 63, pages 241 à 246. Elle permet d'obtenir un rendement à chaque étape de synthèse. Des régions de longueurs d'acides nucléiques variables sont définies par lithographie, et en fin de synthèse, un couplage avec un phosphoramidite comportant de la fluorescéine est effectué sur toutes les sondes de longueurs variables.

Cette méthode permet la mise au point des procédés de synthèse sur support solide mais elle ne permet pas de caractériser les étapes successives de greffage des oligonucléotides avant la fin de la synthèse complète des différents oligonucléotides.

La technique MALDI-TOF ("Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight") décrite dans Little P.D., Anal. Chem. 1997, 69, pages 4540 à 4546, a été mise en oeuvre pour analyser des biopuces comportant des sondes d'ADN. Cette technique est actuellement celle qui permet la meilleure résolution

pour des quantités d'analyse pouvant aller jusqu'à 2,5 fentomole. Malheureusement, elle est destructive et demande une mise en oeuvre spécifique. En effet, les sondes doivent être clivables chimiquement en fin de  
5 synthèse et être co-cristallisées avec un matériau permettant l'absorption du laser utilisé.

Une autre technique encore consiste à effectuer un clivage des sondes après synthèse. Ceci permet leur analyse par HPLC ("High Pressure Liquid  
10 Chromatography"). Cette méthode peut aider à la mise au point de procédés de synthèse sur support solide, mais ne peut en aucun cas être utilisée pour la caractérisation de la synthèse in situ sur substrat structuré.

15

#### **Exposé de l'invention**

La présente invention a précisément pour but de fournir un procédé permettant notamment de qualifier chaque étape de synthèse d'une biopuce et de vérifier  
20 la séquence d'acides nucléiques synthétisés sur le support, leur densité et leur uniformité, ledit procédé palliant les problèmes précités rencontrés dans les techniques de l'art antérieur notamment pour le contrôle de la fabrication des biopuces à acides  
25 nucléiques.

Le procédé de l'invention permet de caractériser, de quantifier et de cartographier une base azotée, un acide nucléique ou une base azotée d'un acides nucléiques, fixé(e) sur un support. Il est caractérisé  
30 en ce qu'il consiste respectivement à caractériser,

quantifier et cartographier ledit acide nucléique ou ladite base azotée par une méthode par effet mirage.

Afin de simplifier la description qui suit, il est fait usage du terme "échantillon" pour désigner une  
5 base azotée, un acide nucléique ou une base azotée d'un acide nucléique fixé(e) sur un support.

Les acides nucléiques et bases azotées sont par exemple décrits dans l'ouvrage "Biochimie Générale", J.H. WEIL, 6ème Edition - MASSON, pages 279-288.

10 Dans la présente description et les revendications en annexe, le terme acide nucléique désigne une chaîne de nucléotides reliés entre eux par des liaisons 3'-5' phosphodiester. Les nucléotides sont des esters phosphoriques des nucléosides, les nucléosides  
15 résultent quant à eux de la liaison d'une base azotée, purique ou pyrimidique, avec un ribose ou un désoxyribose. L'acide nucléique est un acide ribonucléique (ARN) lorsque les nucléotides constituant l'acide nucléique contiennent le ribose, et un acide  
20 désoxyribonucléique (ADN) lorsque les nucléotides constituant l'acide nucléique contiennent le désoxyribose. Les bases azotées sont de manière générale l'adénine (A), la guanine (G), l'uracile (U) et la cytosine (C) lorsque l'acide nucléique est un  
25 ARN, et l'adénine, la guanine, la thymine (T) et la cytosine lorsque l'acide nucléique est l'ADN.

Le procédé de la présente invention permet de caractériser, quantifier, cartographier les acides nucléiques ARN ou ADN, et leurs bases azotées ainsi que  
30 leurs dérivés.

Par dérivés, on entend par exemple des acides nucléiques contenant des dérivés des bases azotées précitées, appelés aussi bases anormales, par exemple la 5-hydroxyméthylcytosine, dérivée de la cytosine.

5 La présente invention fournit également un procédé de fabrication d'une biopuce à acides nucléiques formée notamment d'un support solide sur lequel est fixé au moins un acide nucléique synthétisé in situ, ledit  
10 procédé comprenant au moins un cycle de synthèse et d'analyse incluant notamment d'une part un couplage d'une base azotée pour la synthèse in situ dudit acide nucléique fixé sur le support, et d'autre part, une analyse destinée à contrôler le couplage de ladite base azotée, ladite analyse étant réalisée au moyen d'un  
15 procédé de caractérisation, de quantification ou de cartographie de la présente invention.

Les techniques de synthèse in situ d'acides nucléiques sont décrites notamment dans les ouvrages précités consacrés à la fabrication de biopuces par  
20 exemple dans Caruthers, Science, Octobre 1985, page 281 et suivantes. Le couplage de la base azotée correspond bien entendu à la formation de la liaison 3'-5'phosphodiester précitée entre l'acide nucléique en cours de synthèse et le nucléotide comprenant la base  
25 azotée à coupler.

Il est important de noter ici que les couches minces d'acides nucléiques sont habituellement considérées comme étant non absorbantes. Ceci est notamment décrit dans "Ellipsometric and  
30 interferometric characterization of DNA probes

immobilized on a combinational assay", Gray et al.,  
Langmuir 1997, 13, 2833-2842.

Malgré cela, les présents inventeurs se sont  
intéressés aux méthodes par effet mirage, appelées  
5 aussi méthodes photothermiques.

Ces méthodes ont toutes en commun l'excitation de  
l'échantillon dont l'absorption doit être mesurée par  
une source lumineuse, appelée faisceau pompe, en  
général un laser, modulé à une certaine fréquence. Une  
10 partie de l'énergie lumineuse incidente est absorbée  
par l'échantillon. La proportion d'énergie absorbée est  
fixée par le spectre d'absorption de l'échantillon et  
le spectre d'émission de la source d'excitation. Une  
partie de l'énergie absorbée génère un gradient de  
15 température local engendrant un gradient d'indice.

Les méthodes photothermiques consistent à détecter  
ce gradient d'indice.

Les inventeurs ont astucieusement mis en évidence  
que parmi les méthodes photothermiques, ou méthode par  
20 effet mirage, la méthode de déflexion photothermique  
peut par exemple être utilisée selon la présente  
invention.

La méthode de déflexion photothermique est une  
méthode qui consiste à mesurer la déviation d'un  
25 faisceau lumineux, appelé faisceau sonde, passant dans  
la zone où se trouve le gradient d'indice. En d'autres  
termes, elle consiste à mesurer la déviation du  
faisceau sonde due à l'échauffement d'un échantillon  
absorbant par l'intermédiaire du faisceau pompe. Cette  
30 technique de déflexion photothermique a été appliquée à  
l'analyse de surface telle que la cartographie

d'absorption, l'imagerie de paramètre thermique, mais non pour caractériser, quantifier et cartographier un acide nucléique ou une base azotée d'un acide nucléique fixé(e) sur un support.

5 Une présentation complète, et suffisante pour réaliser la présente invention, des méthodes photothermiques peut être trouvée par exemple dans l'ouvrage "Photothermal Spectroscopy Methods for Chemical Analysis, S.E. Bialkowski, vol. 134 in  
10 Chemical Analysis : a Series of Monographs on Analytical Chemistry and its Applications, Wiley".

Dans le cas d'une méthode de déflexion photothermique, l'acide nucléique, ou la base azotée de l'acide nucléique, est donc éclairé par une lumière  
15 provenant d'une source d'excitation, et l'absorption, la déviation ou la réflexion de la lumière provenant de la source d'excitation par l'acide nucléique, ou par la base azotée, est détectée ou mesurée au moyen d'un faisceau sonde.

20 La figure 1 en annexe est un graphique qui représente la variation, en fonction de la longueur d'onde, du coefficient d'absorption des bases A, T, C, G et U permettant de déterminer les longueurs d'onde de mesure pour le procédé de la présente invention. Sur  
25 cette figure, l'axe des abscisses représente la longueur d'onde  $\lambda$  en nm et l'ordonnée le coefficient d'absorption molaire (C.A.M.) ( $\times 10^{-3}$ ). La référence 60 indique le spectre d'absorption de l'adénine (A), la référence 62 de la thymine (T), la référence 64 de la cytosine (C), la référence 66 de la guanine (G) et la  
30 référence 68 de l'uracile (U). Ces spectres permettent

aussi de choisir la zone des longueurs optimales de sensibilité de l'ADN ou ARN.

Selon l'invention, la source d'excitation peut être par exemple une source cohérente ou une source  
5 incohérente.

Le rôle du faisceau pompe est défini ci-dessus. Il peut provenir par exemple d'un laser pulsé, ou d'un laser continu modulé en intensité, dont la longueur d'onde d'émission est dans la bande d'absorption des  
10 acides nucléiques. Dans le cas des acides nucléiques, les ordres de grandeurs des épaisseurs de couche sont généralement de quelques nanomètres.

Selon l'invention, le faisceau pompe peut donc être une lumière cohérente par exemple un faisceau d'un  
15 laser choisi parmi un laser argon ayant une longueur d'onde de 275 nm, ou un laser solide, par exemple YAG quadruplé, ayant une longueur d'onde de 266 nm. Selon l'invention, l'absorption peut être détectée ou mesurée dans une gamme spectrale allant de 200 à 300 nm.

20 Selon l'invention, le faisceau pompe peut également être une lumière incohérente, par exemple polychromatique, si le spectre d'émission de la source permet d'obtenir suffisamment de signal pour la détection. La lumière incohérente peut par exemple  
25 provenir d'une lampe à vapeur de mercure.

Le faisceau sonde est de préférence dirigé à proximité de la portion d'échantillon éclairée par le faisceau pompe. Par ailleurs, le faisceau sonde peut être identique ou différent du faisceau pompe.

30 Selon l'invention, le faisceau sonde a de préférence une longueur d'onde qui n'est pas absorbée

par le substrat ni les acides nucléiques en présence. Le faisceau sonde est de préférence un faisceau laser. Il peut par exemple avoir une longueur d'onde allant de 400 à 700 nm. Ceci permet de faciliter l'alignement par rapport à l'échantillon, parce que les longueurs d'onde sont dans le domaine du visible. Il peut par exemple être issu d'un laser hélium-néon à 633 nm.

La position relative des faisceaux sonde et pompe définit la configuration employée. Par exemple, le faisceau sonde peut traverser un ou plusieurs des milieux suivants : les acides nucléiques, le support solide, ou le milieu environnant, par exemple, un liquide ou de l'air. L'orientation du faisceau sonde par rapport au faisceau pompe peut être choisie à loisir, par exemple en fonction de l'encombrement mécanique et/ou pour optimiser la sensibilité en cherchant le maximum d'absorption en fonction de l'angle d'incidence.

Selon l'invention, les faisceaux sonde et pompe peuvent se croiser. La position du point de croisement éventuel peut également être fixée à loisir, notamment en fonction de la recherche de l'optimum de sensibilité. En règle générale, le point de croisement se situe dans le maximum du gradient thermique.

Selon l'invention, les faisceaux sonde et pompe peuvent être disposés dans une configuration transverse ou dans une configuration sensiblement colinéaire. Dans la configuration transverse, les faisceaux sonde et pompe se croisent et sont perpendiculaires. Cette configuration est représentée schématiquement sur la figure 2 annexée. Dans la configuration sensiblement



colinéaire, les faisceaux pompe et sonde se croisent mais sont presque colinéaires. La figure 3 annexée est une représentation schématique de la configuration colinéaire.

5 Sur ces figures, la référence 1 indique le faisceau pompe, la référence 3 le faisceau sonde dans la configuration transverse, la référence 3 le faisceau sonde dans la configuration sensiblement colinéaire, la référence 7 un laser, la référence 9 un détecteur tel  
10 qu'un détecteur à quatre quadrants et la référence 11 l'échantillon constitué du support solide sur lequel sont fixés les acides nucléiques.

La réflexion ou la réfraction du faisceau sonde peut être détectée au moyen d'une photodiode multi-  
15 élément, par exemple d'un détecteur à deux ou quatre cadrans, d'une barrette ou d'une matrice, ou à l'aide d'une photodiode simple, soit partiellement recouverte par un cache ou couteau, soit ne recevant qu'une partie du faisceau sonde.

20 Dans le cas d'une photodiode simple, un autre détecteur peut être nécessaire, afin de dissocier les variations d'absorption des acides nucléiques des variations éventuelles de puissance du faisceau pompe.

La figure 4 est une illustration schématique de  
25 différentes configurations de détection de la déviation du faisceau sonde. Sur cette figure, -A- représente schématiquement un détecteur 13 bi-quadrant et un spot 15 formé par le faisceau sonde sur le détecteur, -B- représente un détecteur 4 quadrants, -C- représente un  
30 détecteur matriciel, -D- représente une photodiode

simple partiellement recouverte d'un cache 17, et -E- représente un photodétecteur désaxé.

Pour obtenir une sensibilité suffisante, la déflexion du faisceau sonde induite par l'acide nucléique ou la base azotée de l'acide nucléique, est de préférence distinguée des variations parasites dues à l'environnement, telles que les variations de température du laboratoire. Pour cela, le faisceau pompe peut être marqué temporellement, soit par une modulation s'il est continu, soit par son fonctionnement impulsionnel. La maîtrise de la fréquence de modulation ou de la possibilité d'obtenir un signal de référence permet de détecter préférentiellement la réflexion due à l'échauffement engendré par l'absorption partielle du faisceau pompe.

Quelle que soit la configuration des faisceaux utilisés, l'information obtenue est locale et concerne une zone autour du point d'impact du faisceau pompe sur les oligonucléotides ou la base azotée.

La taille de cette zone peut être fixée par les paramètres expérimentaux tels que la dimension du faisceau pompe au niveau du point d'impact sur l'échantillon ou sa fréquence de modulation, et par le comportement thermique du support, de l'échantillon et du milieu ambiant. Ceci est dû notamment à la diffusion de la chaleur dans ces différents milieux.

L'information étant locale, l'appareil de détection peut être couplé à un système de déplacement du support sur lequel sont fixés les acides nucléiques relativement au faisceau pompe. L'ensemble permet alors de comparer les valeurs de déviation du faisceau sonde

d'un point à l'autre du support, en particulier le signal peut être représenté sous forme de cartographie.

Lorsque cela est nécessaire, le signal de déviation peut être converti en valeur d'absorption par exemple par l'intermédiaire d'un échantillon de référence ou échantillon témoin. Cet échantillon témoin, dont l'absorption est connue et stable, peut faire l'objet d'une mesure de déflexion photothermique dans les mêmes conditions expérimentales que pour les acides nucléiques ou les bases azotées. La valeur obtenue permet par exemple de calculer un coefficient de conversion du signal électrique mesuré en niveau d'absorption.

La modélisation de l'interaction du faisceau sonde avec le faisceau pompe montre que l'on peut mesurer les pertes par absorption de l'échantillon. Comme nous l'avons vu précédemment, l'étalonnage de l'appareil peut être réalisé en mesurant le signal de déflexion d'un échantillon de référence dont l'absorption est a priori connue. Dans le cas où les absorptions sont faibles, on montre que le signal de déflexion photothermique est proportionnel à l'absorption de l'échantillon. On peut donc travailler de manière relative par rapport à l'échantillon de référence.

Avec le procédé de la présente invention, on peut mesurer des pertes par absorption de quelques ppm ( $10^{-6}$ ). On entend par le terme "pertes", le rapport entre la puissance absorbée dans le matériau et la puissance lumineuse incidente. Un mode avantageux de la présente invention peut consister à exploiter l'absorption du faisceau pompe en polarisation P,

c'est-à-dire parallèle au plan d'incidence des oligonucléotides afin d'optimiser la sensibilité de détection. En effet, dans certains cas, l'absorption en polarisation P passe par un maximum à l'angle de  
 5 Brewster du substrat, par exemple 56,6° pour le verre.

Chaque base a un spectre d'absorption spécifique qui peut être exploité. Selon la présente invention, nous suivons l'évolution du signal de photodéflexion en fonction du nombre de base.

10 Au premier ordre, le coefficient d'absorption d'une couche élémentaire s'écrit :

$$A = \alpha e = (4\pi k / \lambda) \cdot e$$

dans laquelle A désigne l'absorption d'une couche élémentaire,  $\alpha$  désigne le coefficient d'absorption, e  
 15 désigne l'épaisseur mécanique, k désigne le coefficient d'extinction de la couche mince et  $\lambda$  la longueur d'onde du faisceau pompe.

Après la croissance de N bases i, nous aurons simplement :

20

$$A = \sum_{i=1}^{i=N} \alpha_i e_i = \sum_{i=1}^{i=N} (4\pi k_i / \lambda) \cdot e_i$$

Dans le domaine de la biologie, on peut également exprimer ce coefficient sous la forme suivante :

$$A = \sum_{i=1}^{i=N} \ln 10 \epsilon_i c_i$$

$\epsilon_i$  et  $c_i$  désignent respectivement le coefficient  
 25 d'extinction molaire ( $\text{l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ) et la concentration ( $\text{mol.l}^{-1}$ ) pour chaque base.

A titre indicatif, les coefficients d'extinction de l'ordre de  $10^{-2}$  à  $10^{-3}$ , et les absorptions mesurables

sont de l'ordre de quelques centaines de ppm. Il s'agit donc de signaux optiques faibles.

Les étapes i interviennent au premier ordre de manière additive sur les étapes précédentes. Le signal  
5 est donc simple à interpréter et permet de suivre l'évolution de la croissance des bases avec les étapes de synthèse in situ des oligonucléotides.

Selon l'invention, le support peut être par exemple un support de verre, de silicium oxydé, de  
10 plastique ou un gel. Ce support peut être par exemple un support plan ou présentant des micro-cavités par exemple des microcuvettes.

Selon l'invention, le premier nucléotide peut être fixé sur le support pour la synthèse in situ par des  
15 réactions classiques de chimie, choisies d'une part suivant le support et d'autre part de manière à fixer le nucléotide sur le support de préférence par liaison covalente. Ces réactions chimiques sont par exemple décrites dans Chemistry Letters, 1998, p. 257-258 et  
20 Analytical Biochemistry 247, p. 96-101, 1997.

La présente invention fournit également un dispositif pour la mise en oeuvre du procédé de la présente invention, en particulier lorsque la méthode est une méthode de déflexion photothermique.

25 Le dispositif comprend les éléments suivants :

- un moyen de positionnement de l'échantillon comprenant un support sur lequel sont fixés les acides nucléiques,
- un moyen d'éclairage de l'échantillon,
- 30 - un moyen de détection et/ou de mesure de l'absorption, de la déviation ou de la

réflexion de la lumière par l'échantillon lorsqu'il est éclairé par ledit moyen d'éclairage, et

- un moyen de positionnement dudit moyen d'éclairage et dudit moyen de détection et/ou de mesure.

Selon l'invention, le moyen de positionnement de l'échantillon peut être tout moyen connu de déplacement précis de l'échantillon par exemple des platines de translation et de rotation micrométriques par exemple de la marque de commerce MicroContrôle ou de la marque de commerce Spinder Hoyer. Ces moyens peuvent être motorisés afin de permettre une automatisation notamment pour une cartographie.

Selon l'invention, les moyens d'éclairage et de détection de l'absorption de la lumière par l'échantillon peuvent être choisis notamment en fonction du support et des acides nucléiques à détecter. Le moyen d'éclairage de l'échantillon peut être par exemple un faisceau pompe tel qu'il est défini précédemment. Le moyen de détection de l'absorption peut comprendre un faisceau sonde et des moyens de détection de la réfraction ou de la réflexion d'un faisceau sonde. Ces moyens sont décrits ci-dessous et dans les exemples suivants.

Selon l'invention, les moyens de positionnement des moyens d'éclairage et de détection précités peuvent être des moyens tels que ceux précités pour le positionnement de l'échantillon.

L'originalité de l'invention repose donc notamment sur le fait que jamais une technique photothermique n'a été utilisée pour caractériser, quantifier et cartographier une base azotée, un acide nucléique ou  
5 une base azotée d'un acide nucléique fixé(e) sur un support. Plus généralement, aucune méthode basée sur la mesure de variation d'absorption n'a été utilisée pour ce type d'analyse sur support.

Le procédé de la présente invention présente  
10 notamment l'avantage de ne nécessiter aucune étape de marquage ni marquage. Il peut être utilisé par exemple avantageusement pour la fabrication de biopuces à acides nucléiques. La caractérisation, quantification et cartographie de chaque base azotée, par exemple à  
15 chaque étape de synthèse in situ d'une biopuce à ADN ou à ARN, permet de suivre avec précision chaque étape de ladite synthèse, et par conséquent, de contrôler la densité, l'uniformité de la densité et la qualité de la biopuce fabriquée et éventuellement de rectifier les  
20 erreurs au cours de la synthèse.

Ceci n'était pas possible avec les techniques de l'art antérieur. Les biopuces obtenues grâce au procédé de la présente invention sont précises, homogènes et facilement reproductibles.

25 Le procédé de la présente invention permet d'optimiser le procédé de synthèse in situ d'oligonucléotides pour la fabrication de biopuces et d'obtenir un rendement de couplage proche de, ou allant jusqu'à, 100%. Cette utilisation sera illustrée dans  
30 les exemples ci-dessous.

D'autres éléments de l'invention et avantages apparaîtront encore à la lecture de la description et des exemples qui suivent en référence aux dessins en annexe, donnés bien entendu à titre illustratif et non  
5 limitatif.

#### Brève description des figures

- 10 - la figure 1 est un graphique qui représente la variation, en fonction de la longueur d'onde, du coefficient d'absorption molaire des bases azotées G, C, T et A ;
- 15 - la figure 2 est un schéma illustrant une déflexion photothermique en configuration transverse pour l'analyse d'un échantillon à tester selon le procédé de la présente invention ;
- 20 - la figure 3 est un schéma illustrant une déflexion photothermique en configuration longitudinale pour l'analyse d'un échantillon à tester selon le procédé de la présente invention ;
- 25 - la figure 4 est une illustration schématique de différentes configurations de détection de la déviation du faisceau sonde;
- la figure 5 est une illustration schématique d'une mesure de l'absorption d'un échantillon par la méthode de déflexion photothermique en configuration transverse selon l'invention ;
- 30 - la figure 6 est un schéma illustrant un dispositif pour la mise en oeuvre du procédé de la présente invention ;



- les figures 7 et 8 montrent schématiquement le mode de détermination de l'"image" après chaque étape de synthèse d'une sonde selon le procédé de la présente invention ;
- 5       - la figure 9 représente l'évolution temporelle des signaux photothermiques obtenus sur des substrats de silice selon la présente invention.

10

**Exemples****Exemple 1 : méthode de mesure**

Le système utilisé dans cet exemple, selon l'invention est basé sur la déflexion photothermique en  
15 configuration transverse.

La figure 5 en annexe est une illustration schématique de principe d'une mesure de l'absorption d'un échantillon constitué d'un acide nucléique ou d'une base azotée d'un acide nucléique fixé(e) sur un  
20 support par la méthode de déflexion photothermique selon l'invention.

Sur cette figure, le faisceau pompe 19 est issu d'un laser argon continu à 275 nm (COHERENT INOVA 40 (marque de commerce) (non représenté), il est focalisé  
25 sur l'échantillon 11 à l'aide d'un miroir sphérique (non représenté), le diamètre du spot (non représenté) est d'environ 70 microns à la surface de l'échantillon 11. La longueur d'onde du faisceau pompe est choisie de manière à permettre la détection des acides nucléiques.  
30 La puissance du faisceau pompe est de 300 mW en sortie du laser.

Le faisceau sonde 21 est celui d'un laser hélium-néon à 633 nm. La longueur d'onde de ce faisceau sonde est indifférente. Selon l'invention, une longueur d'onde éloignée de celle du faisceau pompe permet  
5 d'obtenir un meilleur rapport signal sur bruit.

La détection de la déflection du faisceau sonde 21 est effectuée à l'aide d'un détecteur quatre quadrants -B- (voir figure 3) suivi d'une électronique d'amplification et de soustraction (non représentée). La  
10 référence 21a indique le faisceau sonde dévié par déflection photothermique. L'angle  $\theta$  indique l'angle d'incidence du faisceau pompe 19 par rapport à la normale 20 à l'échantillon (indiquée en trait mixte), et la référence 19a le faisceau pompe 19 réfléchi sur  
15 l'échantillon.

Un filtre interférentiel (non représenté) sélectionnant la longueur d'onde du faisceau sonde peut être placé devant le détecteur quatre quadrants afin d'éviter l'influence d'une lumière parasite provenant  
20 du faisceau pompe modulé.

Dans le dispositif de la présente invention, le laser sonde, le détecteur quatre quadrants et l'électronique associée peut faire partie intégrante d'une cellule de mesure commerciale par exemple celle  
25 de la société ALIS. Le signal issu de cette cellule est envoyé vers une détection synchrone.

Le faisceau pompe peut être modulé grâce à un disque à fente mécanique, appelé aussi ci-après chopper mécanique, dont la fréquence est réglable. Le signal de  
30 commande du chopper sert de référence à la détection synchrone. La fréquence est de 157 Hz. Le signal mesuré

est obtenu à la sortie de la détection synchrone (amplitude du signal de déviation à la fréquence de modulation du faisceau pompe).

Le positionnement de l'échantillon et des deux  
5 faisceaux les uns par rapport aux autres est assuré par des platines de translation et de rotation micrométriques (marque de commerce Micro-Contrôle de la société) dont certaines sont motorisées afin de permettre une automatisation pour une cartographie, par  
10 exemple d'une biopuce, et dans certaines phases du réglage. Les réglages sont effectués automatiquement afin de maximiser le signal de déflexion dans un plan orthogonal à l'échantillon contenant le faisceau sonde. Lors des cartographies, si cela est nécessaire, un  
15 déplacement correctif est effectué dans une direction orthogonale aux axes de balayage de la cartographie afin de garantir la conservation d'un positionnement relatif correct au cours de la cartographie. Ce déplacement correctif est déterminé automatiquement  
20 dans une étape préliminaire de mesure. L'angle d'incidence du faisceau pompe par rapport à la normale à l'échantillon, et l'orientation de la cellule par rapport à l'échantillon, peuvent être réglables. Les positions et orientations relatives des faisceaux sonde  
25 et pompe peuvent être également réglables indépendamment.

Un schéma d'un dispositif selon l'invention est représenté sur la figure 6 annexée. Sur cette figure, un obturateur, non représenté sur le schéma, permet de  
30 couper le faisceau pompe pendant les phases de déplacement et de le rétablir pendant un laps de temps

bien déterminé après un temps d'attente choisi pour permettre la stabilisation du montage après un déplacement. La référence 23 indique un laser argon à 275 nm, la référence 25 des miroirs de positionnement  
5 du faisceau laser, la référence 27 indique un chopper mécanique, la référence 29 le faisceau laser après son passage à travers le chopper, la référence 31 un miroir de focalisation et la référence 35 l'échantillon de mesure, la référence 36 le faisceau hélium-néon sonde  
10 et la référence 37 la photodiode à quatre quadrants.

La répétabilité du positionnement de l'échantillon peut être assurée par exemple par une lunette autocollimatrice qui n'est pas représentée sur le schéma. L'ensemble du dispositif de mesure peut être  
15 piloté par une station de travail, qui commande les déplacements et fait l'acquisition des signaux de déviation dans deux directions orthogonales.

Dans ce mode de réalisation, la déviation est mesurée suivant une direction parallèle au plan de  
20 l'échantillon et suivant une direction orthogonale à celui-ci. C'est cette dernière qui constitue le signal utile. Le signal électronique fourni par la détection synchrone peut être utilisé tel quel par comparaison d'un point à un autre de l'échantillon.

25 On peut également le convertir en valeur d'absorption en effectuant une mesure de référence sur un échantillon réputé stable dans le temps et sous flux laser, dont l'absorption est mesurable au spectrophotomètre et se situe dans la gamme de  
30 linéarité du banc de mesure de déflexion photothermique.

**Exemple 2 : Synthèse in situ d'oligonucléotides sur substrat de silice**

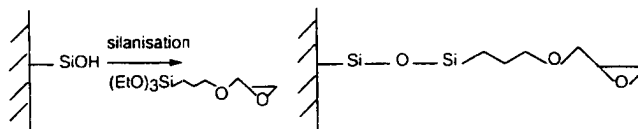
Les substrats de silice utilisés sont de type  
5 Suprasil (Société SESO) et présentent un diamètre de  
50 mm et une épaisseur de 3 mm.

**1 - Hydroxylation de surface**

Une solution contenant 2 g de soude NaOH/6 ml  
10 d'eau désionisée/8 ml d'éthanol à 95% est préparée et  
les substrats sont mis en incubation dans celle-ci  
pendant 2 heures. Les échantillons sont ensuite rincés  
à l'eau désionisée et séchés avec une soufflette à  
azote. Cette étape permet la création de groupements  
15 hydroxyles en surface de la silice (voir formule (I)  
ci-dessous).

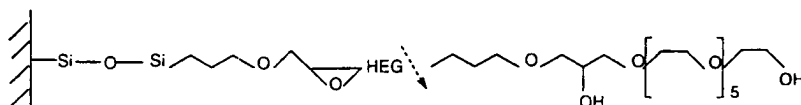
**2 - Silanisation**

2 ml de 3-glucydoxypropyltriméthoxy silane (98%)  
est mis en solution dans 7 ml de toluène et 0,6 ml de  
20 triéthylamine. Les échantillons sont mis dans cette  
solution pendant une nuit à 80°C. Ils sont ensuite  
séchés à l'acétone et à l'azote à l'aide d'une  
soufflette et recuits à 110°C pendant 3 heures. La  
réaction chimique de silanisation peut être schématisée  
25 de la manière suivante :



### 3 - Ouverture de la fonction époxyde

Une solution contenant 30 ml d'hexaéthylèneglycol et 18 µl d'acide sulfurique est utilisée pour permettre l'ouverture de la liaison époxyde et ainsi la fixation  
 5 de l'hexaéthylène glycol. L'ouverture de la fonction époxyde peut être schématisée de la manière suivante :



### 10 4 - Synthèse d'oligonucléotides

La synthèse d'oligonucléotides par voie phosphoramidite est décrite dans le document Caruthers, Sciences, Octobre 1985, page 281. Elle comporte les étapes:

15 de détrytilation, de couplage, d'acétylation, et d'oxydation.

#### Détrytilation :

L'échantillon est mis dans 2 ml d'une solution  
 20 contenant 3% d'acide trichloracétique dans du dichlorométhane (DMT Removal lot 2257-1 de Roth), pendant 2 minutes sous agitation. Il est ensuite rincé dans du dichlorométhane puis dans de l'acétonitrile et séché par jet d'azote sous pression.

25

#### Couplage :

2 ml d'une solution contenant 25 mg de 2'-deoxy-5'-O-diméthoxytrityl-3'-O-(βcyanoéthyl N,N-diisopropyl amino)phosphoramidite sont mélangés à 150 µl de  
 30 tétrazole. L'échantillon est mis dans cette solution

sous agitation sous argon pendant 10 minutes. Il est ensuite rincé dans de l'acétonitrile et séché par jet d'azote sous pression.

5    Capping :

Une solution contenant 1 l de CAP1 et 1 ml de CAP2 est préparée (CAP1 : anhydride acétique/lutidine/THF, CAP2 : 1-méthylimidazole/THF). L'échantillon est mis dans cette solution pendant 2 minutes. Il est ensuite  
10    rincé dans de l'acétonitrile et séché par jet d'azote sous pression.

Oxydation :

L'échantillon est mis dans une solution de 4 ml  
15    d'Oxydation Reagent (iode/eau/pyridine/THF lot 2254.2 de Roth) sous agitation pendant 1 minute. Il est ensuite rincé dans de l'acétonitrile dans du dichlorométhane puis dans de l'acétonitrile, et séché par jet d'azote sous pression.

20

Ces étapes sont reproduites N fois, N étant le nombre de mères de l'oligonucléotide à synthétiser. C'est l'étape de couplage qui détermine la nature de la base de chaque nucléotide (A, C, G, T ou U).

25

Exemple 3 : mesure d'absorption d'oligomères de longueurs différentes :

Cet exemple a été réalisé sur des supports de silice préparés comme dans l'exemple 2, d'épaisseur  
30    comportant 1mère, 2mères et 8mères et de séquences constituées uniquement de bases T.

Le but de cet exemple est de montrer que le procédé de la présente invention permet de différencier la croissance d'un oligonucléotide base par base.

Nous avons réalisé quatre échantillons différents  
5 nommés Ech.1 à Ech.4 avec les méthodes décrites précédemment. Ces échantillons sont les suivants :

Ech.1 : silice/traitement NaOH/ silanisation/HEG,

Ech.2 : silice / traitement NaOH/silanisation/  
10 HEG/synthèse d'un monomère comportant une  
une base T,

Ech.3 : silice/traitement NaOH/silanisation/  
HEG/synthèse d'un dimère comportant une  
base T sur chaque nucléotide,

Ech.4 : silice/traitement NaOH/silanisation/  
15 HEG/synthèse d'un octamère comportant une  
base T sur chaque nucléotide.

1) Paramètres de mesures :

Les mesures ont été faites au moyen d'un laser  
20 argon.

Longueur d'onde 275 nm ; 140 mW de puissance  
échantillon ; fréquence de chopping  $F = 157$  Hz ;  
angle d'incidence  $45^\circ$  ; détection sur deux  
quadrants.

25

2) Mesure :

cartographies sur  $1 \text{ mm}^2$  au centre des échantillons par  
pas de 0,1 mm.

Pour chaque point X, Y, acquisition de  $\text{Absorption} = f(t)$ ,  
30 avec  $0 \leq t \leq 4$  secondes par pas temporel de 100 ms environ.  
L'acquisition se déroule comme suit :



- pour  $0 \leq t < 1$  seconde par d'effet mirage : l'obturateur est fermé,
- à  $t=1$  seconde, ouverture de l'obturateur,
- pour  $1 \leq t \leq 4$  secondes : mesure de l'absorption.

5

Les résultats sont donnés dans le tableau I suivant :

Tableau I

Valeur de l'absorption maximum ( $A_{\max}$ )

10

pour chaque échantillon

Echantillon n°	Nature de l'échantillon	$A_{\max}$ à 275 nm
Ech.1	silane + HEG	225 ua
Ech.2	silane + HEG + oligo 1T	280 ua
Ech.3	silane + HEG + oligo 2T	360 ua
Ech.4	silane + HEG + oligo 8T	730 ua

avec ua : unités d'absorption.

15

La figure 9 annexée représente l'évolution des signaux photothermiques en fonction du temps obtenus sur des substrats de silice comportant de l'hexaéthylène glycol (HEG), un monomère avec une base T (HEG+T), un dimère avec deux bases T (HEG+2T), et un octomère avec huit bases T (HEG+8T).

20

Ces courbes représentent respectivement la référence (pas de base azotée), le signal pour une base T, deux bases T et huit bases T.

**Exemple 4 : détermination d'une image de chaque étape de synthèse d'un oligonucléotide**

La détermination de l'"image" de chaque étape de synthèse se fait par comparaison avec les étapes  
5 précédentes. Des structures de tests sont données schématiquement sur les figures 7 et 8 annexées. Sur ces figures, les structures de tests sont schématisées par les carrés, ou plots, correspondant à des zones par exemple de  $100 \times 100 \mu\text{m}^2$  dans lesquelles la réponse  
10 optique sera mesurée pour le substrat (ref) les quatre bases greffées séparément sur les substrats (A, C, G et T), les dimères greffés correspondant aux différents arrangements possibles dans l'oligonucléotide final (AT, AC, ..., TT).

15 Grâce à ces plots de référence, nous avons mesuré pour chaque base la signature de son absorption pour la ou les longueurs d'onde de mesure. Avec ces mesures d'absorption, on a pu vérifier le nombre de bases G, C, T, A présentes dans la sonde d'oligonucléotide grâce  
20 aux simples soustractions montrées sur la figure 7.

Comme illustré sur la figure 8, par soustractions successives, le signal de chaque base a pu être calculé quel que soit son environnement. Ainsi, dans la première ligne, référencée 80, on a pu déterminer les  
25 signaux de A par rapport à A, C, G et T respectivement, dans la deuxième ligne, référencée 82, on a pu déterminer les signaux de C par rapport à A, C, G et T respectivement, dans la troisième ligne, référencée 84, on a pu déterminer les signaux de G par rapport à A, C,  
30 G et T respectivement et dans la quatrième ligne,

référéncée 86, on a pu déterminer les signaux de T par rapport à A, C, G et T respectivement.

**Exemple 5 : procédé de synthèse d'une biopuce selon**

5 **l'invention**

Comme exposé dans la description et les exemples précédents, la présente invention propose un procédé qui permet d'analyser chaque étape de couplage dans la synthèse in situ d'oligonucléotides sur substrats  
10 structurés.

L'analyse est non-destructrice.

Toutefois, au-delà d'une certaine densité de puissance envoyée sur l'échantillon, les inventeurs ont constaté que l'échantillon pourrait être abîmé de  
15 l'ordre de 1 kW/cm<sup>2</sup>.

## REVENDEICATIONS

1. Procédé de caractérisation d'une base azotée, d'un acide nucléique, ou d'une base azotée d'un acide nucléique, fixé(e) sur un support, ledit procédé consistant à caractériser ledit acide nucléique ou ladite base azotée par une méthode par effet mirage.
2. Procédé de quantification d'une base azotée, d'un acide nucléique, ou d'une base azotée d'un acide nucléique, fixé(e) sur un support, ledit procédé consistant à quantifier ledit acide nucléique ou ladite base azotée par une méthode par effet mirage.
3. Procédé de cartographie de bases azotées, d'acides nucléiques, ou de bases azotées d'acides nucléiques, fixés(es) sur un support, ledit procédé consistant à cartographier lesdits acides nucléiques ou lesdites bases azotées par une méthode par effet mirage.
4. Procédé de fabrication d'une biopuce à acides nucléiques formée notamment d'un support sur lequel est fixé au moins un acide nucléique synthétisé in situ, ledit procédé comprenant au moins un cycle de synthèse et d'analyse incluant notamment d'une part un couplage d'une base azotée pour la synthèse in situ dudit acide nucléique fixé sur le support, et d'autre part, une analyse destinée à contrôler le couplage de ladite base azotée, ladite analyse étant réalisée au moyen d'un procédé de caractérisation selon la revendication 1, de

quantification selon la revendication 2, ou de cartographie selon la revendication 3.

5 5. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, dans lequel la méthode par effet mirage est une méthode de déflexion photothermique.

10 6. Procédé selon la revendication 5, dans lequel la base azotée, l'acide nucléique, ou la base azotée de l'acide nucléique, est éclairé par un faisceau pompe provenant d'une source d'excitation, et l'absorption, la déviation ou la réflexion de la lumière provenant de la source d'excitation par l'acide nucléique, ou par la base azotée, est détectée ou mesurée au moyen d'un  
15 faisceau sonde.

7. Procédé selon la revendication 6, dans lequel le faisceau pompe est une lumière cohérente.

20 8. Procédé selon la revendication 7, dans lequel les faisceaux sonde et pompe se croisent.

25 9. Procédé selon la revendication 6 ou 7, dans lequel les faisceaux sonde et pompe sont en configuration transverse ou colinéaire.

10. Procédé selon la revendication 6, dans lequel l'absorption est détectée ou mesurée dans une gamme spectrale allant de 200 à 300 nm.

11. Procédé selon la revendication 7, dans lequel le faisceau pompe est choisi parmi un laser argon ayant une longueur d'onde de 275 nm, ou un laser solide ayant une longueur d'onde de 266 nm.

5

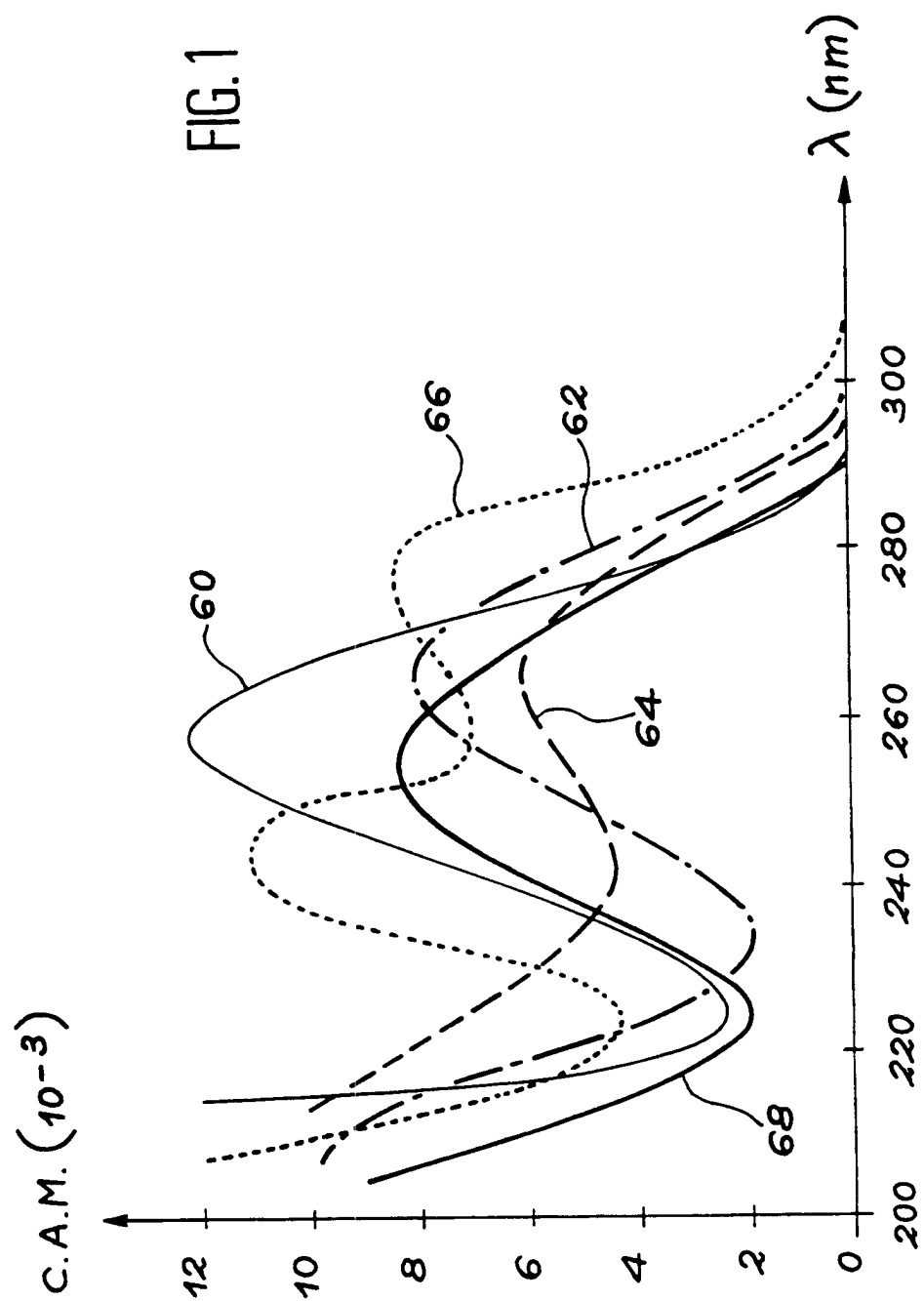
12. Procédé selon la revendication 6, dans lequel la source d'excitation est une source incohérente.

13. Procédé selon l'une quelconque des  
10 revendications 1 à 4, dans lequel respectivement, la caractérisation, la quantification, la cartographie, ou l'analyse est réalisée en polarisation du ou des acides nucléiques présents sur le support.

15 14. Dispositif pour la mise en oeuvre d'un procédé selon la revendication 5, ledit dispositif comprenant les éléments suivants :

- 20 - un moyen de positionnement de l'échantillon comprenant un support sur lequel sont fixés les acides nucléiques,
- un moyen d'éclairage de l'échantillon,
- un moyen de détection et/ou de mesure de l'absorption, de la déviation ou de la réflexion de la lumière par l'échantillon  
25 lorsqu'il est éclairé par ledit moyen d'éclairage, et
- un moyen de positionnement dudit moyen d'éclairage et dudit moyen de détection et/ou de mesure.

30



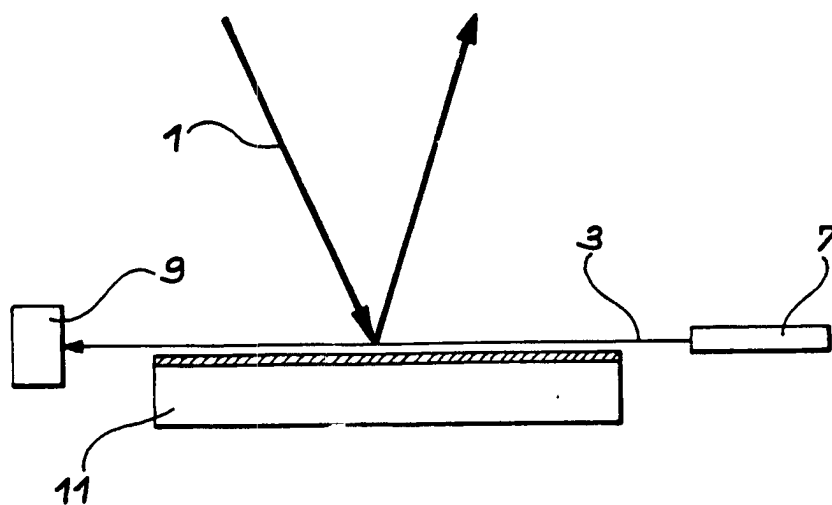


FIG. 2

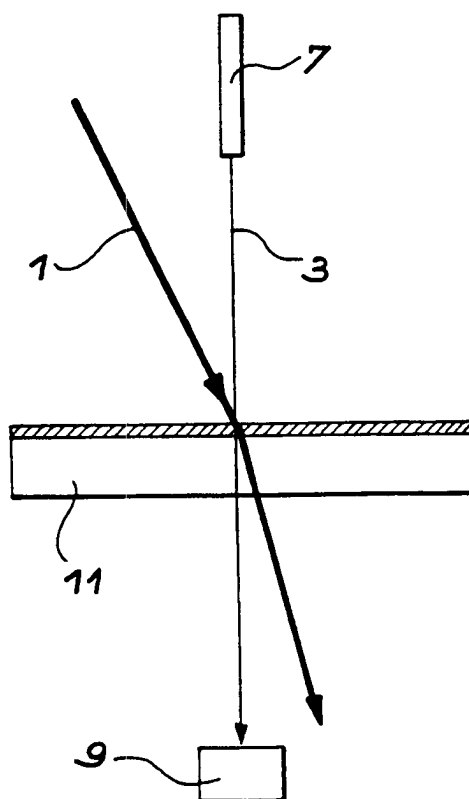


FIG. 3



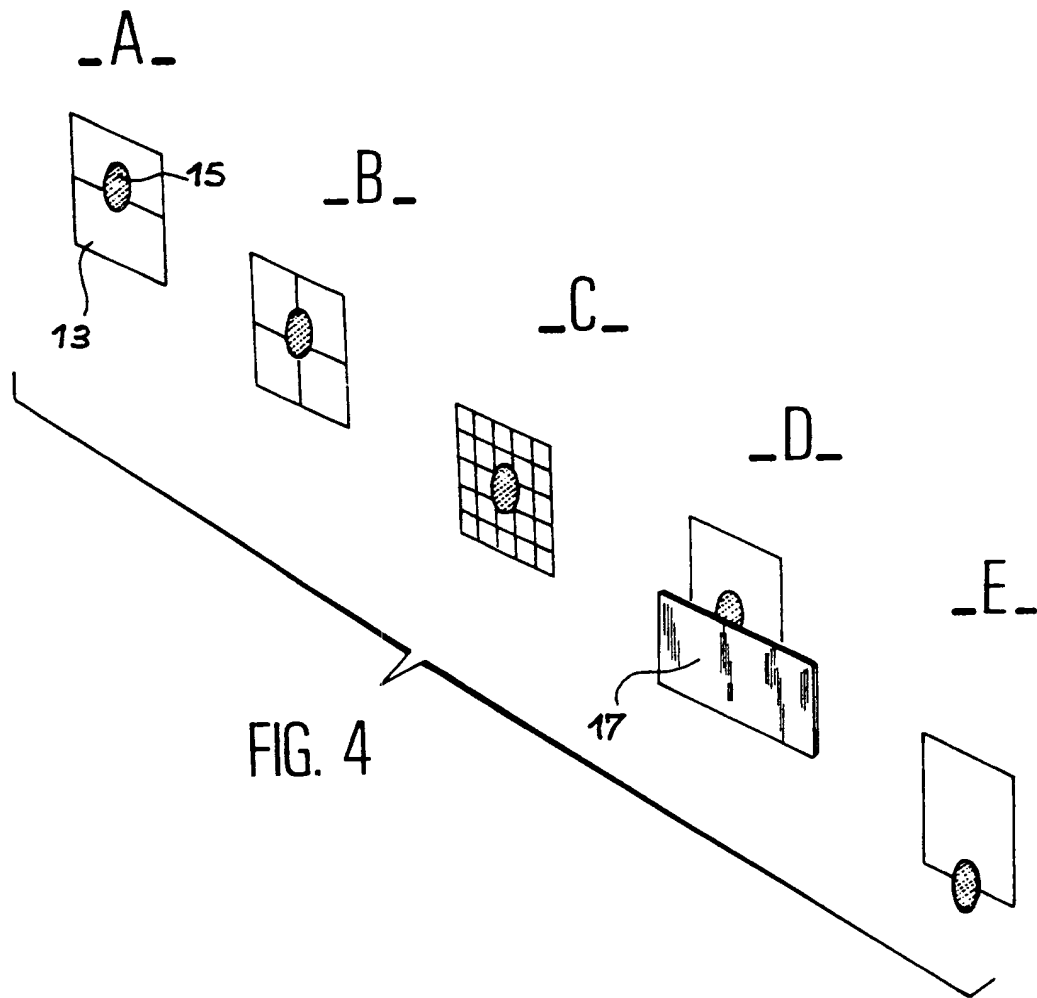
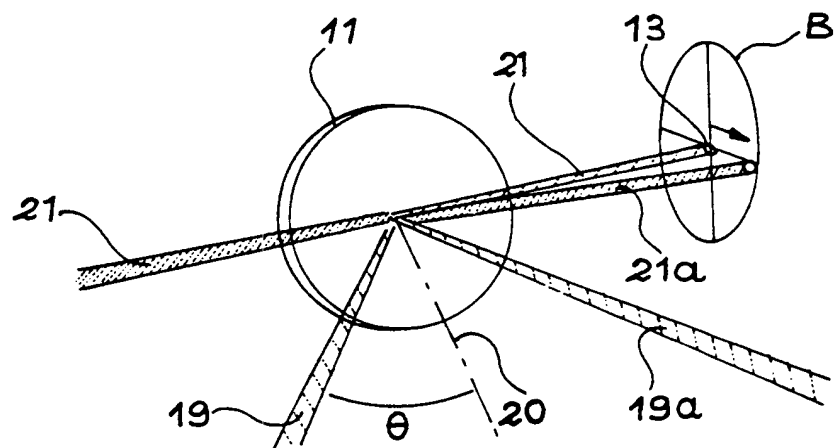


FIG. 5



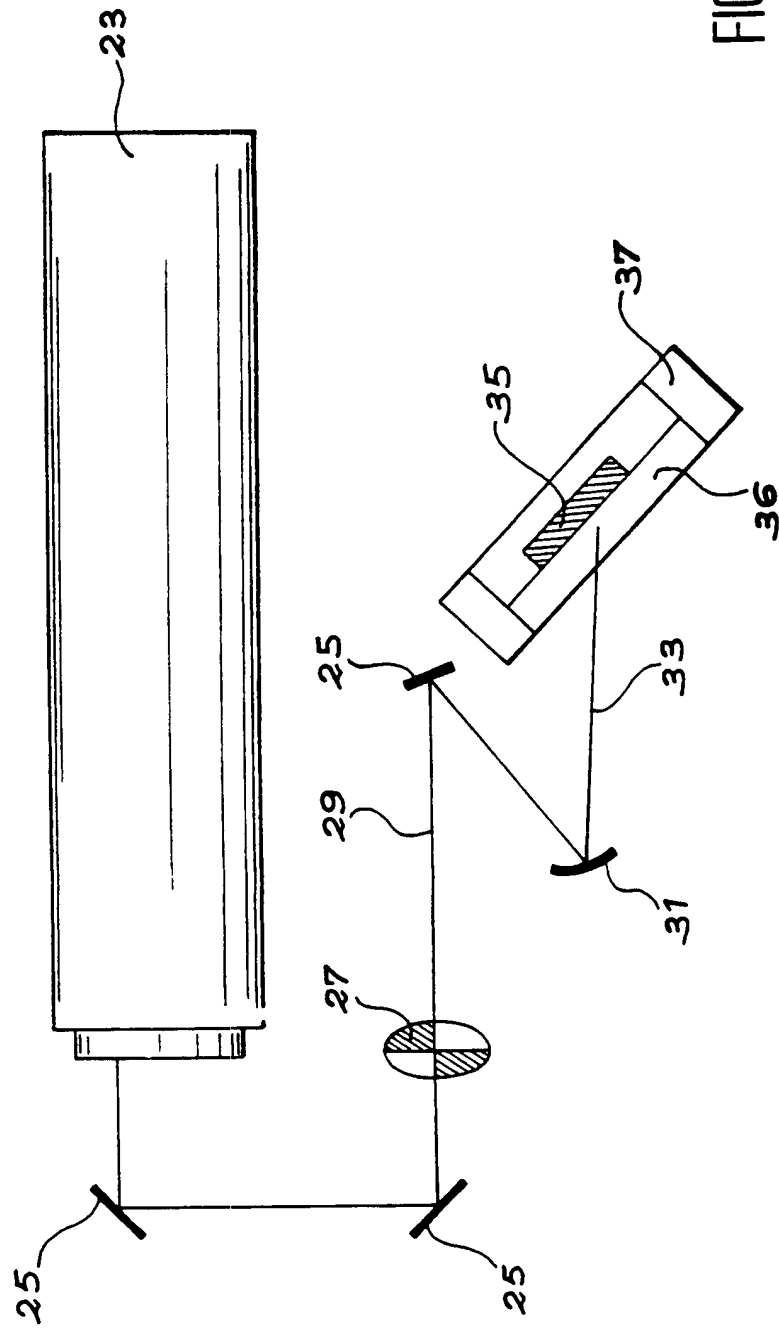


FIG. 6

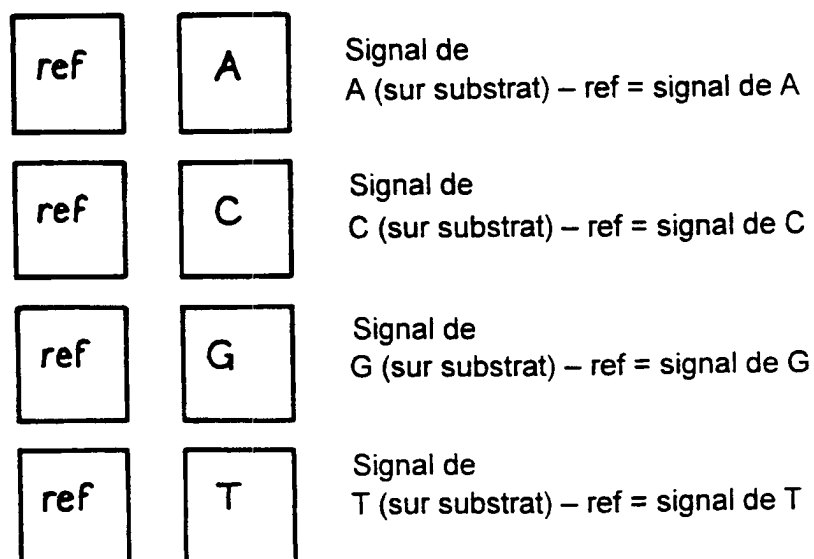


FIG. 7

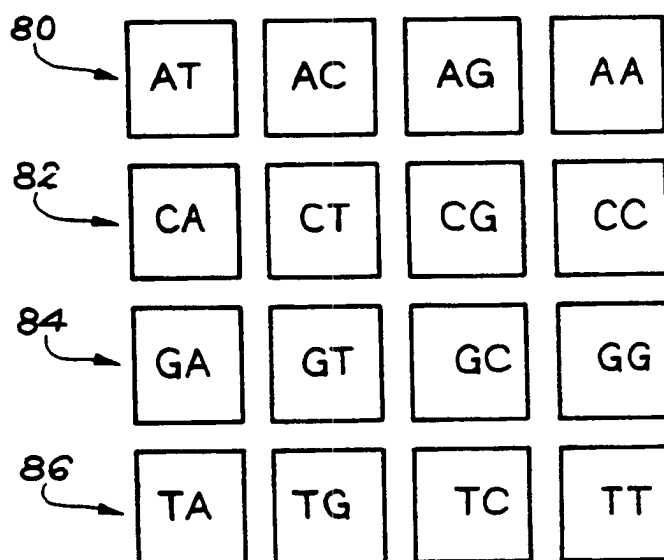
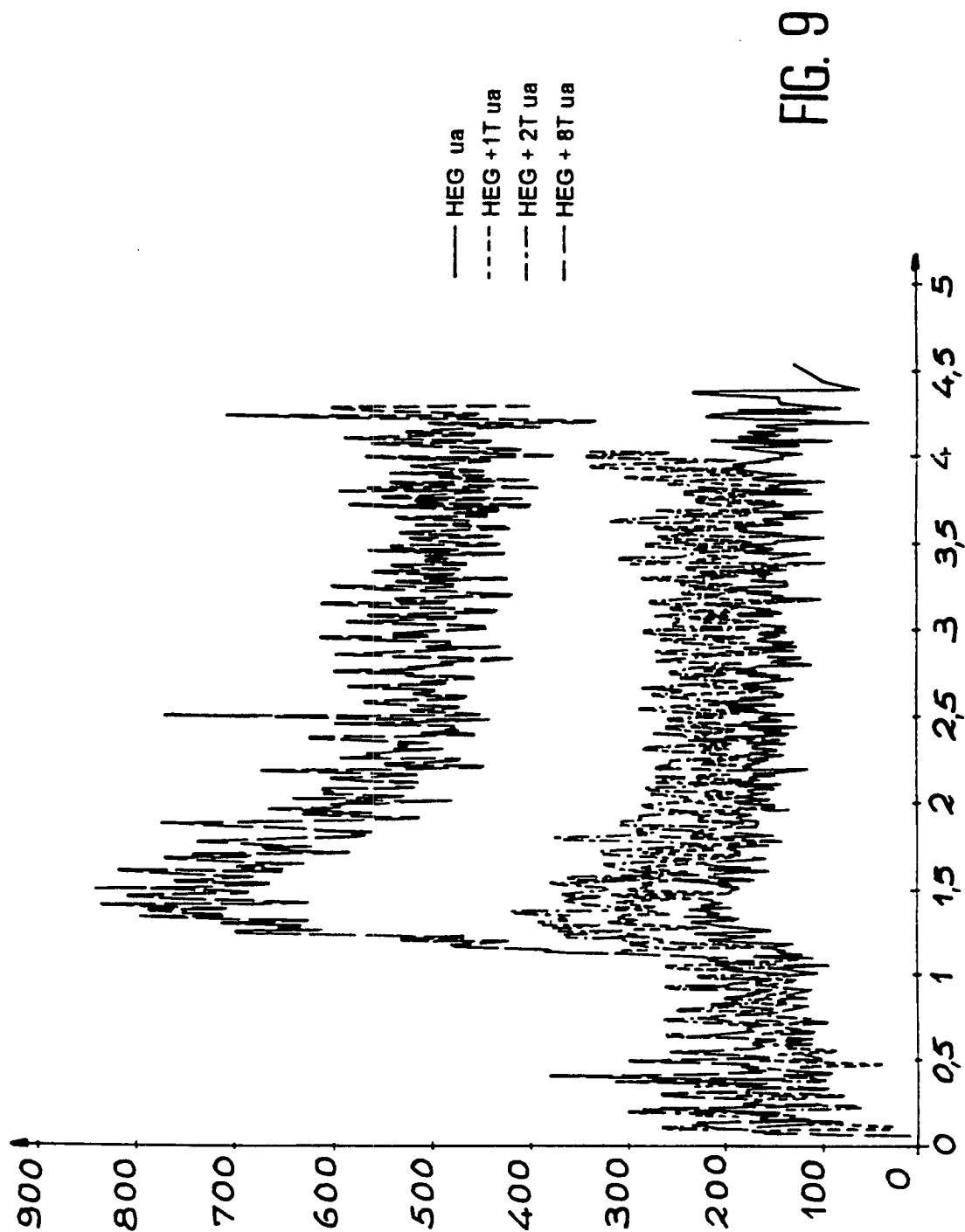


FIG. 8



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. application No.  
PCT/FR 00/02702

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 7 G01N21/17 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7 G01N C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

COMPENDEX, EPO-Internal, INSPEC, WPI Data, PAJ

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ADELHELM K ET AL: "Development of a sensitive detection system based on the photothermal effect for biomolecular interaction studies" BIOMEDICAL OPTOELECTRONICS IN CLINICAL CHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY; BARCELONA, SPAIN SEP 14-15 1995, vol. 2629, 14 September 1995 (1995-09-14), pages 325-333, XP000925207 Proc SPIE Int Soc Opt Eng; Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering 1996 Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers, Bellingham, WA, USA	1,3,5-8, 10-12,14
A	the whole document --- -/--	2,4

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 January 2001

Date of mailing of the international search report

02/02/2001

Name and mailing address of the ISA  
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2000, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Scheu, M

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 00/02702

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 874 213 A (CUMMINS LENDELL L ET AL) 23 February 1999 (1999-02-23) column 1, line 8 - line 11 column 7, line 26 - line 47 column 9, line 11 - line 16 column 9, line 37 - line 46	1,2
X	ODAKE TAMAO ET AL: "High-speed separation using miniaturized slab gel and high spatial resolution detection by thermal lens microscope" PROCEEDINGS OF THE 1998 THERMAL THERAPY, LASER WELDING, AND TISSUE INTERACTION; STOCKHOLM, SWE SEP 9-SEP 11 1998, vol. 3565, 9 September 1998 (1998-09-09), pages 126-133, XP000925278 Proc SPIE Int Soc Opt Eng; Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering 1999 Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers, Bellingham, WA, USA	14
A	the whole document	1
A	KITAMORI T: "Chemistry and analysis in integrated chemistry lab on chip" DIGEST OF PAPERS. MICROPROCESSES AND NANOTECHNOLOGY '99. 1999 INTERNATIONAL MICROPROCESSES AND NANOTECHNOLOGY CONFERENCE, DIGEST OF PAPERS. MICROPROCESSES AND NANOTECHNOLOGY '99. 1999 INTERNATIONAL MICROPROCESSES AND NANOTECHNOLOGY CONFERENCE, YOKOHA, pages 70-71, XP000925538 1999, Tokyo, Japan, Japan Society of Applied Physics, Japan ISBN: 4-930813-97-2 the whole document	1,14

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Search Publication No  
PCT/FR 99/02702

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5874213 A	23-02-1999	US 6045995 A	04-04-2000
		AU 3368695 A	14-03-1996
		WO 9606189 A	29-02-1996
<hr/>			

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. Internationale No  
PCT/FR 00/02702

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 7 G01N21/17 C12Q1/68

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 G01N C12Q

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

COMPENDEX, EPO-Internal, INSPEC, WPI Data, PAJ

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	ADELHELM K ET AL: "Development of a sensitive detection system based on the photothermal effect for biomolecular interaction studies" BIOMEDICAL OPTOELECTRONICS IN CLINICAL CHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY; BARCELONA, SPAIN SEP 14-15 1995, vol. 2629, 14 septembre 1995 (1995-09-14), pages 325-333, XP000925207 Proc SPIE Int Soc Opt Eng; Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering 1996 Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers, Bellingham, WA, USA	1,3,5-8, 10-12,14
A	le document en entier ----- -/--	2,4

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

\*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

\*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

\*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

\*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

\*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

\*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

\*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

\*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

\*Z\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

24 janvier 2001

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

02/02/2001

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Scheu, M



C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	US 5 874 213 A (CUMMINS LENDELL L ET AL) 23 février 1999 (1999-02-23) colonne 1, ligne 8 - ligne 11 colonne 7, ligne 26 - ligne 47 colonne 9, ligne 11 - ligne 16 colonne 9, ligne 37 - ligne 46 ---	1,2
X	ODAKE TAMAO ET AL: "High-speed separation using miniaturized slab gel and high spatial resolution detection by thermal lens microscope" PROCEEDINGS OF THE 1998 THERMAL THERAPY, LASER WELDING, AND TISSUE INTERACTION; STOCKHOLM, SWE SEP 9-SEP 11 1998, vol. 3565, 9 septembre 1998 (1998-09-09), pages 126-133, XP000925278 Proc SPIE Int Soc Opt Eng; Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering 1999 Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers, Bellingham, WA, USA le document en entier ---	14
A	le document en entier ---	1
A	KITAMORI T: "Chemistry and analysis in integrated chemistry lab on chip" DIGEST OF PAPERS. MICROPROCESSES AND NANOTECHNOLOGY '99. 1999 INTERNATIONAL MICROPROCESSES AND NANOTECHNOLOGY CONFERENCE, DIGEST OF PAPERS. MICROPROCESSES AND NANOTECHNOLOGY '99. 1999 INTERNATIONAL MICROPROCESSES AND NANOTECHNOLOGY CONFERENCE, YOKOHA, pages 70-71, XP000925538 1999, Tokyo, Japan, Japan Society of Applied Physics, Japan ISBN: 4-930813-97-2 le document en entier -----	1,14

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No  
PCT/FR 00/02702

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 5874213 A	23-02-1999	US 6045995 A	04-04-2000
		AU 3368695 A	14-03-1996
		WO 9606189 A	29-02-1996
<hr/>			

## TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

## NOTIFICATION D'ELECTION

(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

Commissioner  
 US Department of Commerce  
 United States Patent and Trademark  
 Office, PCT  
 2011 South Clark Place Room  
 CP2/5C24  
 Arlington, VA 22202  
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE  
 en sa qualité d'office élu

<b>Date d'expédition</b> (jour/mois/année) 04 juillet 2001 (04.07.01)	
<b>Demande internationale no</b> PCT/FR00/02702	<b>Référence du dossier du déposant ou du mandataire</b> B 13325.3 EE
<b>Date du dépôt international</b> (jour/mois/année) 29 septembre 2000 (29.09.00)	<b>Date de priorité</b> (jour/mois/année) 30 septembre 1999 (30.09.99)
<b>Déposant</b> VINET, Françoise etc	

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:

☒ dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

17 mars 2001 (17.03.01)

☐ dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection ☒ a été faite

☐ n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).


<b>Bureau international de l'OMPI</b> 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse no de télécopieur: (41-22) 740.14.35	Fonctionnaire autorisé S. Mafla (Fax 338.87.40) no de téléphone: (41-22) 338.83.38
---	--

REC'D 11 FEB 2002

ML 00 PCT

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire B 13325.3 EE		<b>POUR SUITE A DONNER</b> voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR00/02702	Date du dépôt international (jour/mois/année) 29/09/2000	Date de priorité (jour/mois/année) 30/09/1999	
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB G01N21/17			
Déposant COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE et al.			
<p>1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.</p> <p>2. Ce RAPPORT comprend 6 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).</p> <p>Ces annexes comprennent 2 feuilles.</p>			
<p>3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>I <input checked="" type="checkbox"/> Base du rapport</li> <li>II <input type="checkbox"/> Priorité</li> <li>III <input type="checkbox"/> Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle</li> <li>IV <input type="checkbox"/> Absence d'unité de l'invention</li> <li>V <input checked="" type="checkbox"/> Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration</li> <li>VI <input type="checkbox"/> Certains documents cités</li> <li>VII <input type="checkbox"/> Irrégularités dans la demande internationale</li> <li>VIII <input type="checkbox"/> Observations relatives à la demande internationale</li> </ul>			
Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 17/03/2001		Date d'achèvement du présent rapport 07.02.2002	
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465		Fonctionnaire autorisé  Rouault, P  N° de téléphone +49 89 2399 2776	



**RAPPORT D'EXAMEN  
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR00/02702

**I. Base du rapport**

1. En ce qui concerne les **éléments** de la demande internationale (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées dans le présent rapport comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications (règles 70.16 et 70.17)*):

**Description, pages:**

1-31                      version initiale

**Revendications, N°:**

4 (partie),5-10              version initiale

1-3,4 (partie),              reçue(s) avec télécopie du      03/12/2001  
11-13

**Dessins, feuilles:**

1/6-6/6                      version initiale

2. En ce qui concerne la **langue**, tous les éléments indiqués ci-dessus étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue dans laquelle la demande internationale a été déposée, sauf indication contraire donnée sous ce point.

Ces éléments étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue suivante: , qui est :

- ☐ la langue d'une traduction remise aux fins de la recherche internationale (selon la règle 23.1(b)).  
☐ la langue de publication de la demande internationale (selon la règle 48.3(b)).  
☐ la langue de la traduction remise aux fins de l'examen préliminaire internationale (selon la règle 55.2 ou 55.3).

3. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acide aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), l'examen préliminaire internationale a été effectué sur la base du listage des séquences :

- ☐ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.  
☐ déposé avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.  
☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.  
☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.  
☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences par écrit et fourni ultérieurement ne va pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.  
☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous déchiffrable par ordinateur sont identiques à

# RAPPORT D'EXAMEN PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL

Demande internationale n° PCT/FR00/02702

celles du listages des séquences Présenté par écrit, a été fournie.

4. Les modifications ont entraîné l'annulation :

- ☐ de la description, pages :
- ☐ des revendications, n<sup>os</sup> :
- ☐ des dessins, feuilles :

5. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

*(Toute feuille de remplacement comportant des modifications de cette nature doit être indiquée au point 1 et annexée au présent rapport)*

6. Observations complémentaires, le cas échéant :

**V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration**

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications 2, 4, 10-13 Non : Revendications 1, 3, 5-9
Activité inventive	Oui : Revendications 12, 13 Non : Revendications 2, 4, 10, 11
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1-13 Non : Revendications

2. Citations et explications  
**voir feuille séparée**

1. Il est fait référence aux documents suivants:

- D1: ADELHELM K ET AL: 'Development of a sensitive detection system based on the photothermal effect for biomolecular interaction studies' BIOMEDICAL OPTOELECTRONICS IN CLINICAL CHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY;BARCELONA, SPAIN SEP 14-15 1995, vol. 2629, 14 septembre 1995 (1995-09-14), pages 325-333, XP000925207 Proc SPIE Int Soc Opt Eng;Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering 1996 Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers, Bellingham, WA, USA
- D2: US-A-5 874 213 (CUMMINS LENDELL L ET AL) 23 février 1999 (1999-02-23)
- D3: ODAKE TAMAO ET AL: 'High-speed separation using miniaturized slab gel and high spatial resolution detection by thermal lens microscope' PROCEEDINGS OF THE 1998 THERMAL THERAPY, LASER WELDING, AND TISSUE INTERACTION;STOCKHOLM, SWE SEP 9-SEP 11 1998, vol. 3565, 9 septembre 1998 (1998-09-09), pages 126-133, XP000925278 Proc SPIE Int Soc Opt Eng;Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering 1999 Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers, Bellingham, WA, USA

2. Pertinence des documents D1 et D2:

Les documents D1 et D2 divulguent des procédés de détection d'acides nucléiques par une méthode par effet mirage. Cependant, comme rien dans ces documents ne suggère de réaliser la détection d'acides nucléiques sans les avoir marqués au préalable au moyen de molécules absorbantes, ces documents ne sont plus considérés comme étant pertinents vis-à-vis des nouvelles revendications indépendantes 1 à 3, qui toutes revendiquent un non marquage des espèces à détecter.

3. Nouveauté de la revendication indépendante 1 vis-à-vis de D3:

Le document D3 (voir l'abrégé et les figures) révèle un procédé de détection d'acides nucléiques (fragments d'ADN) en deux étapes. La première étape consiste à séparer un échantillon d'ADN en une pluralité de fragments d'ADN par électrophorèse effectuée sur un gel supportant ledit échantillon. La deuxième étape concerne la détection desdits fragments d'ADN fixés sur ledit gel à l'aide d'une méthode par effet mirage.

Comme il n'est pas indiqué dans ce document que la détection nécessite d'associer auxdits fragments des molécules absorbantes pour favoriser la détection (voir l'ensemble du document), et comme un procédé de détection peut être considéré comme un procédé de caractérisation, le document D3 divulgue par conséquent un procédé identique à celui défini dans la nouvelle revendication 1 de la demande.

Par conséquent, la présente demande ne satisfait pas aux conditions énoncées dans l'article 33 (2) PCT.

4. Revendication indépendante 2:

Etant donné que l'amplitude du signal photothermique détecté est clairement fonction de la concentration de l'espèce détectée (voir D3, page 127, dernier paragraphe), l'homme du métier lisant D3 n'hésiterait pas à appliquer le procédé décrit dans ce document pour une analyse quantitative. Il réaliserait ainsi un procédé tel que défini dans la revendication 2 de la demande, sans avoir besoin de faire preuve d'activité inventive. Il en résulte que la présente demande ne répond pas aux exigences définies dans l'article 33 (3) PCT.

5. Revendication indépendante 3:

Comme il est clair dans le document D3 qu'un balayage du support (gel) est effectué (voir par exemple les figures 2 et 3), le procédé de D3 est considéré comme un procédé de cartographie.



L'objet de cette revendication n'est donc pas nouveau.

6. Revendications dépendantes:

- 6.1 L'application de la méthode de détection décrite dans D3 à l'analyse d'un support tel que défini dans la revendication 4 serait évidente pour l'homme du métier, car il serait clair pour cet homme du métier que le gel utilisé dans D3 peut être remplacé par n'importe quel support adéquat.
- 6.2 L'objet des revendications 5-9 n'est pas nouveau, eu égard au document D3 (voir en particulier la page 130).
- 6.3 Les caractéristiques des revendications 10 et 11 ne sont pas inventives, car selon les acides nucléiques à détecter, l'homme du métier serait naturellement amené à choisir un domaine de détection et un laser d'excitation tels que définis dans ces revendications.
- 6.4 Par contre, l'objet des revendications 12 et 13 semble être nouveau et inventif par rapport à l'état de la technique disponible.

**REVENDICATIONS**

1. Procédé de caractérisation d'une base azotée, d'un acide nucléique, ou d'une base azotée d'un acide nucléique, fixé(e) sur un support, ledit procédé consistant à caractériser ledit acide nucléique ou ladite base azotée sans marquage par une méthode par effet mirage.

2. Procédé de quantification d'une base azotée, d'un acide nucléique, ou d'une base azotée d'un acide nucléique, fixé(e) sur un support, ledit procédé consistant à quantifier ledit acide nucléique ou ladite base azotée sans marquage par une méthode par effet mirage.

3. Procédé de cartographie de bases azotées, d'acides nucléiques, ou de bases azotées d'acides nucléiques, fixés(es) sur un support, ledit procédé consistant à cartographier lesdits acides nucléiques ou lesdites bases azotées sans marquage par une méthode par effet mirage.

4. Procédé de fabrication d'une biopuce à acides nucléiques formée notamment d'un support sur lequel est fixé au moins un acide nucléique synthétisé in situ, ledit procédé comprenant au moins un cycle de synthèse et d'analyse incluant notamment d'une part un couplage d'une base azotée pour la synthèse in situ dudit acide nucléique fixé sur le support, et d'autre part, une analyse destinée à contrôler le couplage de ladite base azotée, ladite analyse étant réalisée au moyen d'un procédé de caractérisation selon la revendication 1, de

34

11. Procédé selon la revendication 7, dans lequel le faisceau pompe est choisi parmi un laser argon ayant une longueur d'onde de 275 nm, ou un laser solide ayant une longueur d'onde de 266 nm.

5

12. Procédé selon la revendication 6, dans lequel la source d'excitation est une source incohérente.

10 13. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, dans lequel respectivement, la caractérisation, la quantification, la cartographie, ou l'analyse est réalisée en polarisation du ou des acides nucléiques présents sur le support.

15

# TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

## PCT

### RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et règles 43 et 44 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire <b>B 13325.3 EE</b>	<b>POUR SUITE</b> voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT/ISA/220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après <b>A DONNER</b>	
Demande internationale n° <b>PCT/FR 00/ 02702</b>	Date du dépôt international (jour/mois/année) <b>29/09/2000</b>	(Date de priorité (la plus ancienne) (jour/mois/année) <b>30/07/1999</b>
Déposant <b>COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE</b>		

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau international.

Ce rapport de recherche internationale comprend 4 feuilles.

☒ Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

#### 1. Base du rapport

- a. En ce qui concerne la **langue**, la recherche internationale a été effectuée sur la base de la demande internationale dans la langue dans laquelle elle a été déposée, sauf indication contraire donnée sous le même point.
- ☐ la recherche internationale a été effectuée sur la base d'une traduction de la demande internationale remise à l'administration.
- b. En ce qui concerne **les séquences de nucléotides ou d'acides aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), la recherche internationale a été effectuée sur la base du listage des séquences :
- ☐ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- ☐ déposée avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences présenté par écrit et fourni ultérieurement ne vas pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.
- ☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous forme déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences présenté par écrit, a été fournie.

2. ☐ **Il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche** (voir le cadre I).

3. ☐ **Il y a absence d'unité de l'invention** (voir le cadre II).

#### 4. En ce qui concerne le **titre**,

- ☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.
- ☐ Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:

#### 5. En ce qui concerne l'**abrégi**,

- ☐ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant
- ☒ le texte (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38.2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.

#### 6. La figure **des dessins** à publier avec l'abrégi est la Figure n°

- ☐ suggérée par le déposant.
- ☒ parce que le déposant n'a pas suggéré de figure.
- ☐ parce que cette figure caractérise mieux l'invention.

5

☐ Aucune des figures n'est à publier.

**RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE**

Requête internationale n°

PCT/FR 00/02702

**Cadre III    TEXTE DE L'ABREGE (suite du point 5 de la première feuille)**

L'abrégé a été modifié comme suit:

Ligne 5 : après "photothermique" ajouter "ou par effet mirage."

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De l'Organisation internationale No  
PCT/FR 00/02702

**A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE**  
CIB 7 G01N21/17 C12Q1/68

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

**B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE**

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)  
CIB 7 G01N C12Q

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)  
COMPENDEX, EPO-Internal, INSPEC, WPI Data, PAJ

**C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS**

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	ADELHELM K ET AL: "Development of a sensitive detection system based on the photothermal effect for biomolecular interaction studies" BIOMEDICAL OPTOELECTRONICS IN CLINICAL CHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY;BARCELONA, SPAIN SEP 14-15 1995, vol. 2629, 14 septembre 1995 (1995-09-14), pages 325-333, XP000925207 Proc SPIE Int Soc Opt Eng;Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering 1996 Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers, Bellingham, WA, USA	1,3,5-8, 10-12,14
A	le document en entier --- -/--	2,4

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- \*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- \*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- \*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- \*S\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

24 janvier 2001

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

02/02/2001

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Scheu, M

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

D. le Internationale No  
PCT/FR 00/02702

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	US 5 874 213 A (CUMMINS LENDELL L ET AL) 23 février 1999 (1999-02-23) colonne 1, ligne 8 - ligne 11 colonne 7, ligne 26 - ligne 47 colonne 9, ligne 11 - ligne 16 colonne 9, ligne 37 - ligne 46 ----	1,2
X	ODAKE TAMAO ET AL: "High-speed separation using miniaturized slab gel and high spatial resolution detection by thermal lens microscope" PROCEEDINGS OF THE 1998 THERMAL THERAPY, LASER WELDING, AND TISSUE INTERACTION; STOCKHOLM, SWE SEP 9-SEP 11 1998, vol. 3565, 9 septembre 1998 (1998-09-09), pages 126-133, XP000925278 Proc SPIE Int Soc Opt Eng; Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering 1999 Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers, Bellingham, WA, USA le document en entier ----	14
A	le document en entier ----	1
A	KITAMORI T: "Chemistry and analysis in integrated chemistry lab on chip" DIGEST OF PAPERS. MICROPROCESSES AND NANOTECHNOLOGY '99. 1999 INTERNATIONAL MICROPROCESSES AND NANOTECHNOLOGY CONFERENCE, DIGEST OF PAPERS. MICROPROCESSES AND NANOTECHNOLOGY '99. 1999 INTERNATIONAL MICROPROCESSES AND NANOTECHNOLOGY CONFERENCE, YOKOHA, pages 70-71, XP000925538 1999, Tokyo, Japan, Japan Society of Applied Physics, Japan ISBN: 4-930813-97-2 le document en entier -----	1,14

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 00/02702

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5874213 A	23-02-1999	US 6045995 A	04-04-2000
		AU 3368695 A	14-03-1996
		WO 9606189 A	29-02-1996
-----			



A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 7 G01N21/17 C12Q1/68

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 G01N C12Q

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

COMPENDEX, EPO-Internal, INSPEC, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	ADELHELM K ET AL: "Development of a sensitive detection system based on the photothermal effect for biomolecular interaction studies" BIOMEDICAL OPTOELECTRONICS IN CLINICAL CHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY; BARCELONA, SPAIN SEP 14-15 1995, vol. 2629, 14 septembre 1995 (1995-09-14), pages 325-333, XP000925207 Proc SPIE Int Soc Opt Eng; Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering 1996 Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers, Bellingham, WA, USA le document en entier ---	1,3,5-8, 10-12,14
A	--- -/--	2,4

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

\*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

\*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

\*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

\*G\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

24 janvier 2001

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

02/02/2001

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Scheu, M

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	US 5 874 213 A (CUMMINS LENDELL L ET AL) 23 février 1999 (1999-02-23) colonne 1, ligne 8 - ligne 11 colonne 7, ligne 26 - ligne 47 colonne 9, ligne 11 - ligne 16 colonne 9, ligne 37 - ligne 46 ---	1,2
X	ODAKE TAMAQ ET AL: "High-speed separation using miniaturized slab gel and high spatial resolution detection by thermal lens microscope" PROCEEDINGS OF THE 1998 THERMAL THERAPY, LASER WELDING, AND TISSUE INTERACTION; STOCKHOLM, SWE SEP 9-SEP 11 1998, vol. 3565, 9 septembre 1998 (1998-09-09), pages 126-133, XP000925278 Proc SPIE Int Soc Opt Eng; Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering 1999 Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers, Bellingham, WA, USA	14
A	le document en entier ---	1
A	KITAMORI T: "Chemistry and analysis in integrated chemistry lab on chip" DIGEST OF PAPERS. MICROPROCESSES AND NANOTECHNOLOGY '99. 1999 INTERNATIONAL MICROPROCESSES AND NANOTECHNOLOGY CONFERENCE, DIGEST OF PAPERS. MICROPROCESSES AND NANOTECHNOLOGY '99. 1999 INTERNATIONAL MICROPROCESSES AND NANOTECHNOLOGY CONFERENCE, YOKOHA, pages 70-71, XP000925538 1999, Tokyo, Japan, Japan Society of Applied Physics, Japan ISBN: 4-930813-97-2 le document en entier -----	1,14

### Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

PCT/FR 00/02702

Formulaire PCT/ISA/210 (annexe familles de brevets) (juillet 1992)